

GUIDA PRATICA PER L'ESECUZIONE DI PROVE MICROBIOLOGICHE SU ALIMENTI E ACQUE



Regione Toscana



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

**Guida pratica per l'esecuzione di prove microbiologiche
su alimenti e acque**

*Questo libro è dedicato con affetto
al dr. Angelo Viti,
biologo, collega
e amico insostituibile*

Guida pratica per l'esecuzione di prove microbiologiche su alimenti e acque

a cura di

Ademaro Rinaldi Lazzerini e Patrizia Tinti, ARPAT



Regione Toscana



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

Firenze, maggio 2012

Guida pratica per l'esecuzione di prove microbiologiche su alimenti e acque

A cura di: *Ademaro Rinaldi Lazzerini e Patrizia Tinti*, ARPAT

Si ringraziano per la collaborazione:

Lido Ballati, biologo, la cui esperienza è stata indispensabile contributo per la stesura del IV capitolo.

Rosanna Lena, biotecnologa, per aver revisionato il lavoro, e per aver fornito con professionale competenza e conoscenza preziosi e opportuni suggerimenti.

©ARPAT 2012

Coordinamento editoriale: Silvia Angiolucci, ARPAT
Redazione e realizzazione grafica: Gabriele Rossi, ARPAT
Foto del capitolo III Acque: Francesco Mantelli, ARPAT
Copertina: Grafica *effegiesse*, ARPAT

Realizzazione editoriale ARPAT, Firenze, maggio 2012

ISBN: 9788896693100



9788896693100

Per suggerimenti e informazioni sulla pubblicazione:

ARPAT, Settore Comunicazione, informazione e documentazione

via N.Porpora 22 – 50144 Firenze. Tel 055.32061, fax 055.3206324, e-mail comunicazione@arpat.toscana.it

Prefazione	p.8
I PARTE – ALIMENTI	p.9
1.1 Preparazione e semina campioni	p.10
1.2 Schemi di diagnostica batteriologica	p.14
1.2.1 Prove di sterilità metodo - (Numero più probabile Metodo MPN/g o mL)	p.15
1.2.2 Carica batterica mesofila (UNI EN ISO 4833:2004)	p.16
1.2.3 Ricerca coliformi metodo MPN (UNI EN ISO 4831).....	p.17
1.2.4 Ricerca coliformi (UNI EN ISO 4832:2006)	p.18
1.2.5 Ricerca enterobacteriaceae (UNI EN ISO 21258-2:2004).....	p.19
1.2.6 Ricerca di Salmonella spp (UNI EN ISO 6579:2008).....	p.20
1.2.7 Ricerca di Salmonella su uova fresche (ISTISAN 96/35).....	p.21
1.2.8 Ricerca di Salmonella nei molluschi (ISTISAN 96-35).....	p.22
1.2.9 Ricerca <i>Escherichia coli</i> (UNI EN ISO 16649-2:2001).....	p.23
1.2.10 Ricerca <i>Yersinia enterocolitica</i> (ISTISAN 96-35).....	p.24
1.2.11 <i>Listeria monocytogenes</i> (negli alimenti escluso latte e derivati) (ISTISAN 96-35).....	p.25
1.2.12 <i>Listeria monocytogenes</i> (nel latte e derivati) (ISTISAN 96-35).....	p.26
1.2.13 Numerazione di <i>Listeria monocytogenes</i> (ISTISAN 96-35).....	p.27
1.2.14 <i>Listeria monocytogenes</i> (UNI EN ISO 11290-1:2005).....	p.28
1.2.15 <i>Listeria monocytogenes</i> (metodo per la conta) (UNI EN ISO 11290-2:2005).....	p.29
1.2.16 Ricerca del <i>Vibrio cholerae</i> (ISTISAN 96-35)	p.30
1.2.17 Ricerca del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ISTISAN 96-35)	p.31
1.2.18 Ricerca <i>Campylobacter</i> termoresistente (ISTISAN 96-35).....	p.32
1.2.19 Metodo orizzontale per la conta di <i>Bacillus cereus</i> presunto (UNI EN ISO 7932:2005).....	p.33
1.2.20 Numerazione <i>Bacillus cereus</i> (ISTISAN 96-35).....	p.34
1.2.21 Ricerca di <i>Clostridium botulinum</i> e sue tossine (Tipo A B E) (ISTISAN 96-35)	p.35
1.2.22 Ricerca delle spore di <i>Clostridium botulinum</i> e identificazione (ISTISAN 96-35).....	p.36
1.2.23 Conta di batteri solfito riduttori negli alimenti (ISO 15213:2003)	p.37
1.2.24 Numerazione <i>Clostridium perfringens</i> (ISTISAN 96-35).....	p.38
1.2.25 Metodo orizzontale per la conta di Stafilococchi coagulasi positivi (<i>S. aureus</i> e altre specie) (UNI EN ISO 6888-1:2004)	p.39
1.2.26 <i>Staphylococcus aureus</i> (ISTISAN 96-35).....	p.40
1.2.27 <i>Staphylococcus aureus</i> (Tecnica MPN) (ISTISAN 96-35).....	p.41
1.2.28 Conta <i>Pseudomonas</i> spp carne e prodotti a base di carne (ISO 13720:2010).....	p.42
1.2.29 Conta <i>Pseudomonas</i> spp in latte e derivati (ISO/TS 11059:2009).....	p.43
1.2.30 Conta batteri lattici mesofili negli alimenti (ISO 15214:1998)	p.44
1.2.31 Ricerca lieviti e muffe (ISTISAN 96-35).....	p.45
1.2.32 Conta lieviti e muffe in alimenti con aw >0.95 (ISO 21527-1:2008)	p.46
1.2.33 Conta lieviti e muffe in alimenti con aw ≤0.95 (ISO 21527-2:2008)	p.47
1.2.34 Filth test sfarinati e prodotti di trasformazione.....	p.48
1.2.35 Schema riassuntivo dei terreni colturali per ricerche microbiologiche su alimenti.....	p.49
II PARTE - ACQUE	p.52
2.1. Normativa e modalità	p.53
2.1.1 Acque potabili	p.54
2.1.2 Acque minerali	p.55
2.1.3 Schema operativo di prelievo.....	p.56
2.1.4 Tabella tempi massimi e accettabili raccomandati per la conservazione dei campioni dei campioni di acque per analisi microbiologiche	p.57

2.2 Schemi di diagnostica batteriologica	p.58
2.2.1 Ricerca Legionella spp. Campionamento e prelievo.....	p.59
2.2.2 Determinazione della carica batterica a 22 °C e 36 °C nelle acque (ISO 6222:1999).....	p.61
2.2.3 Conteggio delle colonie su agar 22°C e 37°C (ISTISAN 07/5 Riferimento UNI EN ISO 6222:01) (Acque per il consumo umano, di piscina, acque e soluzioni di dialisi).....	p.62
2.2.4 Determinazione dei batteri coliformi a 37°C (ISS A 006A ISTISAN 07-5) - <i>Escherichia coli</i> (ISS A001A ISTISAN 07-5).....	p.63
2.2.5 Coliformi totali (APAT CNR-IRSA 7010) Manuali e linee guida 29-2003) (Acque superficiali, di fiume, di lago,acque reflue anche sottoposte a trattamento).....	p.64
2.2.6 Determinazione dei batteri coliformi a 37°C (ISS A 006B Rev.00 Rap. ISTISAN 07-5) (Acque per il consumo umano, di piscina, acque e soluzioni di dialisi).....	p.65
2.2.7 Coliformi totali - Metodo membrane filtranti (MF) APAT CNR-IRSA 7010C - Manuali e linee guida 29-2003 (Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento)	p.66
2.2.8 Coliformi fecali - Metodo membrane filtranti (MF) APAT CNR-IRSA 7020B - Manuali e linee guida 29-2003) (Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento)	p.67
2.2.9 Ricerca <i>Escherichia coli</i> (APAT CNR-IRSA7030) - Manuali e linee guida 29/2003 (Metodi A-B-C-D-E-F) (Acque superficiali, di fiume,di lago,reflue anche trattate e acque con materiale in sospensione).....	p.68
2.2.10 Determinazione di <i>Escherichia coli</i> (prova normalizzata) (ISTISAN 07-5 ISS A 001B Rev.00 UNI EN ISO 9308-1:2002).....	p.69
2.2.11 Determinazione di <i>Escherichia coli</i> (prova rapida) (ISTISAN 07-5 ISS A 001C Rev.00 UNI EN ISO 9308-1:2002).....	p.70
2.2.12 Determinazione degli enterococchi (ISTISAN 07-5 ISS A002A UNI EN ISO 7899-2:2003)	p.71
2.2.13 Streptococchi fecali ed enterococchi - Metodo membrane filtranti. Manuali e linee guida APAT CNR-IRSA 7040 Manuali e linee guida 29-2003 (Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento).....	p.72
2.2.14 Determinazione enterobatteri patogeni: Salmonella (ISS A 011A Rev.00 ISTISAN 07-5)	p.73
2.2.15 Determinazione enterobatteri patogeni: Salmonella (ISS A 011B Rev.00 ISTISAN 07-5)	p.74
2.2.16 Determinazione enterobatteri patogeni: Salmonella (ISS A 011C Rev.00 ISTISAN 07-5)	p.75
2.2.17 Ricerca Salmonella spp su acque superficiali, di fiume, di lago, e su acque reflue sottoposte a trattamento (APAT CNR-IRSA 7080 Manuali e linee guida 29-2003).....	p.76
2.2.18 Determinazione enterobatteri patogeni : Shigella (ISS A 012A Rev 00 ISTISAN 07-5)	p.77
2.2.19 Determinazione enterobatteri patogeni : Shigella (ISS A 012B Rev 00 ISTISAN 07-5)	p.78
2.2.20 Determinazione enterobatteri patogeni : Shigella (ISS A 012C Rev 00 ISTISAN 07-5)	p.79
2.2.21 Enterobatteri patogeni: Vibrio (ISS A 013A Rev. 00 ISTISAN 07-5).....	p.80
2.2.22 Determinazione Stafilococchi patogeni (ISS A 018A Rev. 00 ISTISAN 07-5)	p.81
2.2.23 Determinazione Stafilococchi patogeni (ISS A 018B Rev. 00 ISTISAN 07-5).....	p.82
2.2.24 Determinazione di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ISS A 003A Rev.00 ISTISAN 07-5 UNI EN ISO 12780:2002).....	p.83
2.2.25 Batteri opportunisti patogeni: Aeromonas spp (ISS A 014A Rev.00 ISTISAN 07-5).....	p.84
2.2.26 Determinazione di <i>Clostridium perfringens</i> (ISS A 005A Rev.00 ISTISAN 07-5) solo su acque provenienti o contaminate da acque superficiali.....	p.85
2.2.27 Determinazione di <i>Clostridium perfringens</i> (ISS A 005B Rev.00 ISTISAN 07-5) solo su acque provenienti o contaminate da acque superficiali.....	p.86
2.2.28 Spore di clostridi solfito riduttori (APAT CNR-IRSA 7060 Manuali e linee guida. 29-2003) (Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento).....	p.87
2.2.29 Determinazione dei funghi (Acque destinate al consumo umano, acque di piscina, acque trattate e soluzioni di dialisi): ISTISAN 07-5 Metodo ISS A 016A Rev00. ISTISAN 07-5 Metodo ISS A 016B Rev 00. ISTISAN 07-5 Metodo ISS A 016C Rev.00	p.88
2.2.30 Acque minerali (DM 13.01.93 G.U. n. 14 19.01.93) (Modalità operative)	p.89
2.2.31 Schema riassuntivo dei terreni colturali per ricerche microbiologiche su acque.....	p.90

III PARTE - TERRENI DI COLTURA - REAGENTI E SOLUZIONI	p.93
3.1 Premessa terreni	p.94
3.2 Valutazione della produttività e selettività dei terreni colturali per prove microbiologiche	p.95
3.3 Terreni di coltura	p.96
IV PARTE - INDICAZIONI VALIDAZIONE METODI - STIMA INCERTEZZA - ESPRESSIONE DEI RISULTATI- TABELLE	p.153
Definizioni.....	p.154
4.1 Validazione metodi di prova microbiologici	p.160
4.1.1 Validazione metodi di prova microbiologici qualitativi	p.160
4.1.1.1 Validazione mediante confronto dei risultati ottenuti con un metodo di riferimento.....	p.160
4.1.1.2 Validazione mediante prove su campione a valore noto.....	p.160
4.1.1.3 Criteri di valutazione delle prestazioni del metodo.....	p.161
4.1.2 Validazione metodi di prova microbiologici quantitativi – Valutazione delle capacità degli operatori a eseguire prove.....	p.162
4.1.2.1 Modalità operative.....	p.163
4.1.2.2 Pianificazione del processo di validazione di un metodo quantitativo.....	p.163
4.1.2.3 Criteri di valutazione.....	p.168
4.1.3 Linearità (proporzionalità delle diluizioni).....	p.169
4.1.3.1 Valutazione della linearità (proporzionalità delle diluizioni).....	p.169
4.1.4 Determinazione dei parametri sensibilità-specificità- efficienza-selettività del metodo	p.170
4.1.4.1 Calcoli.....	p.170
4.1.4.2 Valutazione dei risultati.....	p.170
4.1.5 Validazione secondaria	p.171
4.1.5.1 Metodo 1 : UNI 10674:2002.....	p.171
4.1.5.2 Metodo 2 :ISO 14461/IDF 169:2005.....	p.172
4.1.5.3 Metodo 3 :UNI EN ISO 4833:2004.....	p.174
4.2 Incertezza del risultato analitico microbiologico	p.176
4.2.1 Incertezza (intervallo di fiducia) stimata sulla base della distribuzione di Poisson.....	p.176
4.2.1.1 Conteggio e stima dell'intervallo di fiducia a seguito della semina su piastra di un campione con esecuzione di n.1 prova singola.....	p.176
4.2.1.2 Incertezza (intervallo di fiducia) stimata sulla base della distribuzione di Poisson approssimata alla normale (15 – 300 UFC/piastra)	p.178
4.2.1.3 Conteggio e intervallo di fiducia con formula riportata nella ISO 7218:2007.....	p.178
4.2.1.4 Incertezza (intervallo di fiducia) di misura nei prodotti destinati al consumo umano e animale e nei campioni ambientali secondo la ISO/TS 19036:2006 + ISO 19036:2006/Amd/1:2009.....	p.180
4.2.1.5 Incertezza (intervallo di fiducia) di misura nelle acque secondo la ISO 8199:2008.....	p.182
4.3 Determinazione del valore MPN ISO 7218:2007	p.184
Tabelle	p.186
Tabella n.1 MPN (Mac Crady).....	p.187
Tabella n.2 di Poisson	p.188
Tabelle n.3 e 4 intervallo di confidenza del conteggio su piastra Petri-Probabilità 95%	p.189
Bibliografia	p.190

Prefazione

L'interesse che ha suscitato presso gli addetti ai lavori la prima uscita della guida pratica delle prove microbiologiche ci ha spinto alla stesura di questa nuova edizione tenendo conto dell'evoluzione normativa dei sistemi gestione qualità e delle metodiche analitiche.

Lo spirito e il carattere di questa nuova pubblicazione rimane sempre quello di voler offrire all'analista una traccia pratica, sintetica e di facile consultazione, ovvero uno strumento che lo possa accompagnare giornalmente nel suo lavoro nel rispetto delle norme vigenti.

La guida è divisa in quattro parti: la prima parte è dedicata agli alimenti, la seconda alle acque, la terza ai terreni di coltura, la quarta parte infine è dedicata alle indicazioni sulla validazione dei metodi e stima dell'incertezza di misura.

Le metodiche microbiologiche indicate per gli alimenti e le acque, al momento della stesura, fanno riferimento a quelle emesse da organismi riconosciuti (ISO, CEN, UNI, APAT, ISTISAN) o da disposizioni di legge cogenti (D.Lgs, DM). Sono metodi analitici schematizzati in diagrammi di flusso che sintetizzano la procedura e comunque sarà cura dell'utilizzatore verificare l'ultima edizione del documento.

La terza parte raccoglie i terreni colturali usati nelle metodiche descritte e la loro preparazione, reperibili in commercio presso le varie ditte specializzate nel settore.

L'ultimo capitolo è dedicato a tabelle di natura statistica. E' questo un aspetto che sempre più interessa in campo microbiologico perché la validità dei metodi utilizzati è direttamente proporzionale alla loro riproducibilità e ripetibilità, inoltre la stima dell'incertezza di un risultato è l'unico dato che permette la verifica e la corrispondenza dei risultati ottenuti da altri laboratori.

Speriamo di aver prodotto con questo manuale, riveduto e ampliato rispetto alla prima pubblicazione, uno strumento utile e versatile, che possa, attraverso le sue schematiche illustrazioni, essere di rapida e facile interpretazione e soprattutto di aiuto al tecnico nella pratica quotidiana.

Ci scusiamo per eventuali errori e inesattezze in cui possiamo essere incorsi e saremo grati a quanti avranno la bontà di segnalarli.

Ademaro Rinaldi Lazzerini, Patrizia Tinti, ARPAT

1

Alimenti



1.1 Preparazione e semina campioni

Dal campione da analizzare prelevare asepticamente e in modo rappresentativo, quindi in più punti, 30 g di prodotto (*m*) e trasferirlo in contenitore sterile.

Aggiungere il diluente misurato in mL nella quantità di 9 x *m*, in modo da ottenere una diluizione 1:10 (usare per praticità la notazione esponenziale negativa, esempio -1 come abbreviazione della diluizione 1:10).

Il diluente, al momento dell'uso e salvo casi particolari, deve avere all'incirca la stessa temperatura del campione. A parte norme specifiche, i diluenti generalmente usati sono:

Buffered Peptone Water (**T42**)¹, Acqua triptonata sterile (**T112**), Brodo di arricchimento (**T27**), Acqua peptonata (**T03**)

Campioni solidi o semisolidi

Pesarli in sacchetti sterili di plastica speciale ad alta resistenza o vasetti sterili per mixer.

Prodotti secchi

Per i prodotti duri o secchi, non omogeneizzare in omogenizzatore a rotazione per più di 2,5 minuti alla volta.

Per prodotti secchi e duri o eterogenei, può essere necessario tritare o macinare il campione di laboratorio. In questo caso, per evitare un eccessivo aumento della temperatura, non tritare o macinare per più di un minuto.

Campioni surgelati

I prodotti conservati congelati dovrebbero essere portati a una consistenza che consenta il campionamento, per esempio mediante conservazione da 18 a 27°C (temperatura di laboratorio) per un massimo di tre ore, oppure a $2 \pm 2^\circ\text{C}$ per un massimo di 24 ore. Dopodiché i campioni dovrebbero essere sottoposti a prova il più rapidamente possibile.

Se il prodotto è ancora congelato al momento della suddivisione, è possibile utilizzare un diluente a temperatura di laboratorio per facilitarne lo scongelamento.

Campioni liquidi e non viscosi

Prima delle analisi il campione di prova dovrebbe essere prelevato dopo un'agitazione manuale (per esempio 25 volte per una lunghezza di 25 cm.), o con mezzi meccanici al fine di garantire la uniforme distribuzione dei microrganismi. Il campione può essere esaminato tal quale o diluito direttamente.

Campioni liquidi viscosi

Dopo l'aggiunta del diluente e dopo l'omogenizzazione procedere alla separazione delle fasi. Utilizzare la fase acquosa per le diluizioni necessarie.

Campioni eterogenei

Per i prodotti eterogenei (che contengono pezzi di alimenti diversi) il campionamento dovrebbe essere effettuato prelevando aliquote di ciascun componente rappresentativo delle relative porzioni del prodotto iniziale.

E' inoltre possibile omogeneizzare l'intero campione di laboratorio per consentire il prelevamento di un campione di prova omogeneizzato.

Può essere necessario tritare o macinare il campione di laboratorio. In questo caso, per evitare un eccessivo aumento della temperatura, non tritare o macinare per più di un minuto.

Campioni di carne

Prelevare asepticamente piccoli pezzi di circa 1 cm³ e quindi omogenizzarli.

¹ I codici tra parentesi indicano i terreni di coltura e i reagenti descritti nella Parte IV "Terreni di coltura – Reagenti e soluzioni".

Campioni in polvere

I prodotti in polvere dovrebbero essere completamente miscelati nel loro contenitore e pesati direttamente in condizioni asettiche. Può essere necessario, per alcuni prodotti, spezzettarli o tagliarli in piccoli pezzi usando strumenti sterili.

Campioni di burro

Sciogliere in un contenitore sterile, e in bagnomaria a 45°C, 10 g del campione. Aggiungere 90 mL di diluente di Ringer 1/4 (**T94**). Mantenere in bagnomaria fino a completa fusione mescolando.

Attendere la separazione della materia grassa della fase acquosa (2 mL della fase indiluita corrispondono a 1 g di burro).

Campioni di formaggi

Omogenizzare la quantità per le analisi con il diluente riscaldato a 45°C.

Campioni di latte

Per le prove di sterilità (latte sterilizzato - UHT - pastorizzato) ripartire in due aliquote uguali un campione casuale di 10 confezioni. Preincubare un aliquota a 55°C per 7 giorni e l'altra a 32°C per 14 giorni. Prima dell'inizio delle analisi agitare e capovolgere per circa 25 volte il contenitore al fine di assicurare una distribuzione il più uniforme possibile del prodotto ed iniziare le analisi entro 3 minuti.

Campioni di uova fresche

Prelevare 10 uova da varie confezioni dello stesso lotto. La ricerca della salmonella deve essere condotta sia sul guscio sia sul tuorlo-albume. Dopo aver separato asetticamente i gusci dal tuorlo e dall'albume tritare i primi in stomacher con BPW (**T42**) nel rapporto ponderale di 1:10. I tuorli e gli albumi vanno anch'essi omogenizzati in stomacher prelevandone poi 50 gr. trasferendoli in 450 mL di BPW.

Omogenizzazione

Se per l'omogenizzazione dei campioni viene usato un omogenizzatore ad alta velocità (mixer) iniziare con brevi impulsi fino a raggiungere alla fine 15000 - 20000 giri/minuto per un tempo di circa 2 minuti.

Usando un apparecchio di tipo peristaltico (stomacher) omogenizzare per circa 2 minuti.

Dopo l'omogenizzazione lasciare il campione a riposo per circa 10 minuti.

Diluizioni successive

Nel caso occorra procedere a diluizioni decimali successive trasferire dalla prima diluizione (-1) con pipetta sterile 10 mL del campione in bottiglia contenente 90 mL di H₂O triptonata sterile 0.1% (**T112**) (diliz.-2). Chiudere e agitare la bottiglia per circa 25 volte. Se richiesto trasferire da questa (-2) altri 10 mL in una nuova bottiglia con 90 mL di H₂O triptonata sterile 0.1% (diluiz. -3), e così di seguito fino a raggiungere la diluizione desiderata.

Semina campioni su piastre Petri (tecnica pour plate)

Preparare 1 o 2 piastre Petri piccole (diametro 90 mm) (in base al numero indicato nel metodo di prova) o una grande (diametro 140 mm) per ogni diluizione allestita e trasferire con pipetta sterile 1 mL in ciascuna piastra della diluizione da saggiare, aggiungere entro 20 minuti 15 mL di terreno fuso in precedenza e mantenuto prima dell'uso in bagno-maria a 50°C circa. Mescolare delicatamente e far solidificare.

In casi particolari può essere necessario, dopo solidificazione, aggiungere altri 5 mL del terreno in modo da formare un secondo strato.

Semina in superficie (tecnica spread plate)

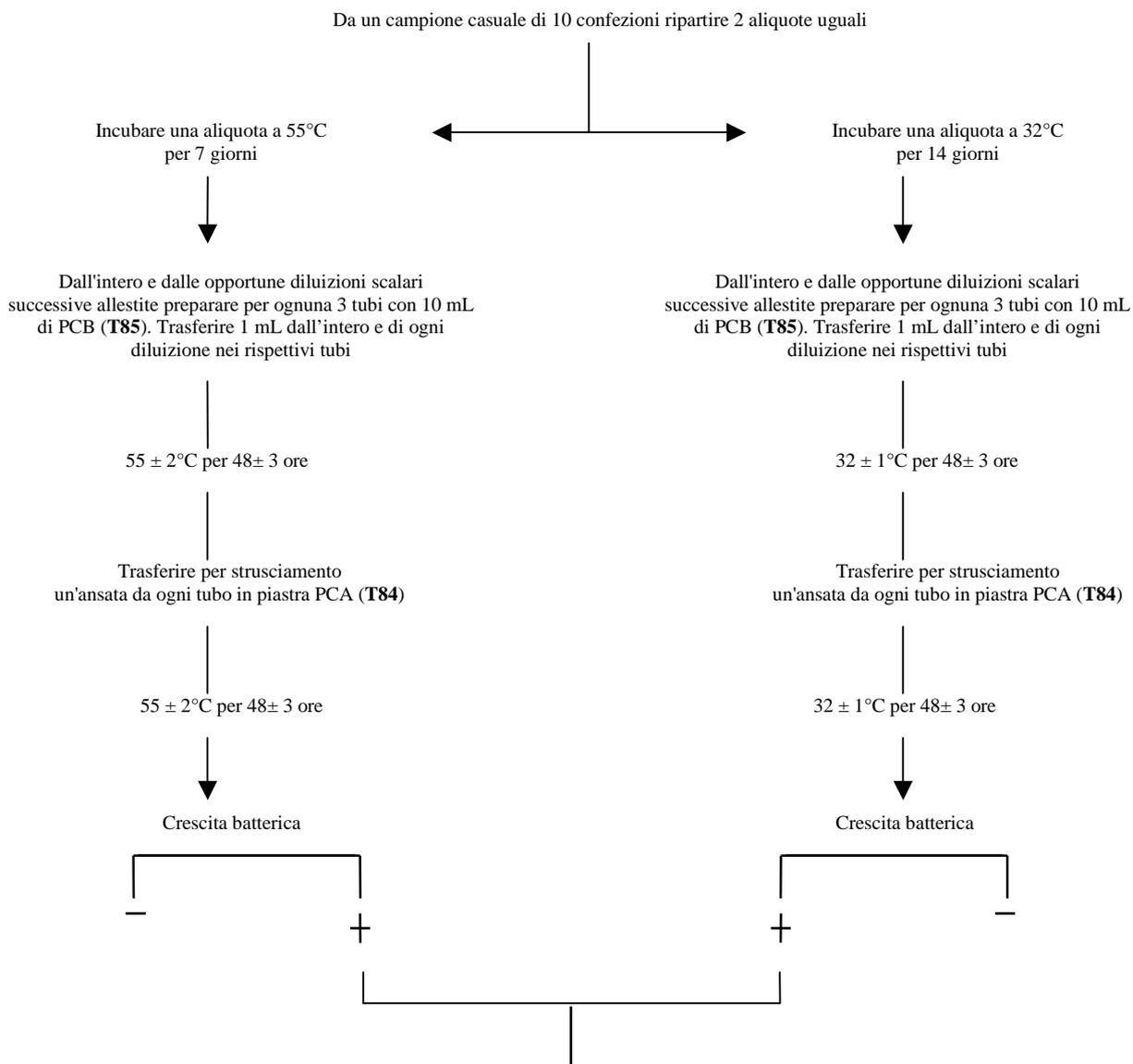
Distribuire su terreno già solidificato in piastra Petri 1 mL del campione da analizzare usando 1 o 2 piastre (in base al numero indicato nel metodo di prova) per ogni diluizione allestita.

Spargere l'inoculo sull'intera superficie della piastra, usando bacchette sterili se necessario, ed attendere il completo assorbimento prima di riporla in termostato.

Nota: *per i metodi di prova in cui è previsto inoculare due piastre per diluizione, è possibile inoculare una sola piastra per diluizione invece di due, come specificato nella ISO 7218:2004 (p.to 10.2.2). Specificare tale modifica nel Rapporto di Prova.*

1.2 Schemi di diagnostica batteriologica

1.2.1 Prove di sterilità (Numero più probabile - Metodo MPN/g o mL)



*** Riportare a MPN il numero di piastre con crescita batterica.**

* Per risalire al numero più probabile (MPN/g o mL) considerare le piastre appartenenti a 3 diluizioni consecutive significative assegnando 1 ad ogni piastra positiva e 0 a quella negativa: Sommare i valori ottenuti per ciascun gruppo. Cercare il corrispondente valore nelle tabelle di Mac Crady (Tab. n.1) e moltiplicarlo per l'inverso del fattore di diluizione.

1.2.2 Carica batterica mesofila UNI EN ISO 4833:2004

CARATTERISTICHE I batt. mesofili si moltiplicano a temp. 20-45 °C (37°C). Elevato tasso di crescita e proliferazione relativamente breve (fase stazionaria 24-48 ore). Trattati per la maggior parte di saprofiti anche se non mancano specie comuni e patogeni sia per l'uomo che per gli animali.

ALIMENTI Alimenti conservati a temperatura ambiente o refrigerati qualora vi sia stata interruzione nella catena del freddo.

TECNICHE DI ISOLAMENTO

Prelevare in più punti ed asetticamente 30 g di prodotto dal campione da analizzare. Trasferirlo in contenitore sterile ed aggiungere 270 mL di BPW (T42) diluizione 1:10 (-1) Soluzione madre.



Omogeneizzare la soluzione madre per circa 2 min. con apparecchio ad alta velocità (mixer) o con apparecchio tipo peristaltico (stomacher). Lasciar riposare per circa 10 minuti



Dalla soluzione madre e dalle successive diluizioni allestite (almeno 2) con TW (T112) fino a coprire l'intervallo microbico sospettato (in genere -5 -6) preparare 2 piastre per ogni diluizione prevista



15 mL di PCA (T84) o di AG (T10) per escludere i lattobacilli.
Agitare delicatamente e far solidificare



30 ± 1 °C 72 ± 3 ore

ESPRESSIONE RISULTATO (formula generale) ISO 7218:2007 →
$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} = \text{UFC mL/g}$$

PROBABILITÀ	ESPRESSIONE DEL RISULTATO
• Se in piastra < 10 ma 4 UFC	applicare la formula generale (n. stimato)
• Se il totale compreso tra 3 e 1 UFC	UFC presenti ma con < 4 UFC x d mL/g
• Se d ₁ >150 UFC tipiche o confermate e d ₂ < 150 UFC non tipiche o confermate	UFC < 1/d ₂ >1d ₁ per mL/g
• Se d ₁ >150 UFC non tipiche o confermate e d ₂ <150 UFC non tipiche o confermate	UFC < 1/d ₂ per mL/g
• Se d ₁ tra 150 e 167 UFC E d ₂ tra 8 e10 UFC	Applicare la formula generale
• Se d ₁ > 167 e d ₂ tra 8 - 10 UFC	Valida solo d ₂ UFC = $N = \frac{C}{V * d}$
• Se d ₁ >167 e d ₂ <8 UFC	Risultato inaccettabile
• Se tutte le diluizioni >167UFC	UFC >150/du (du = diluizione più elevata)

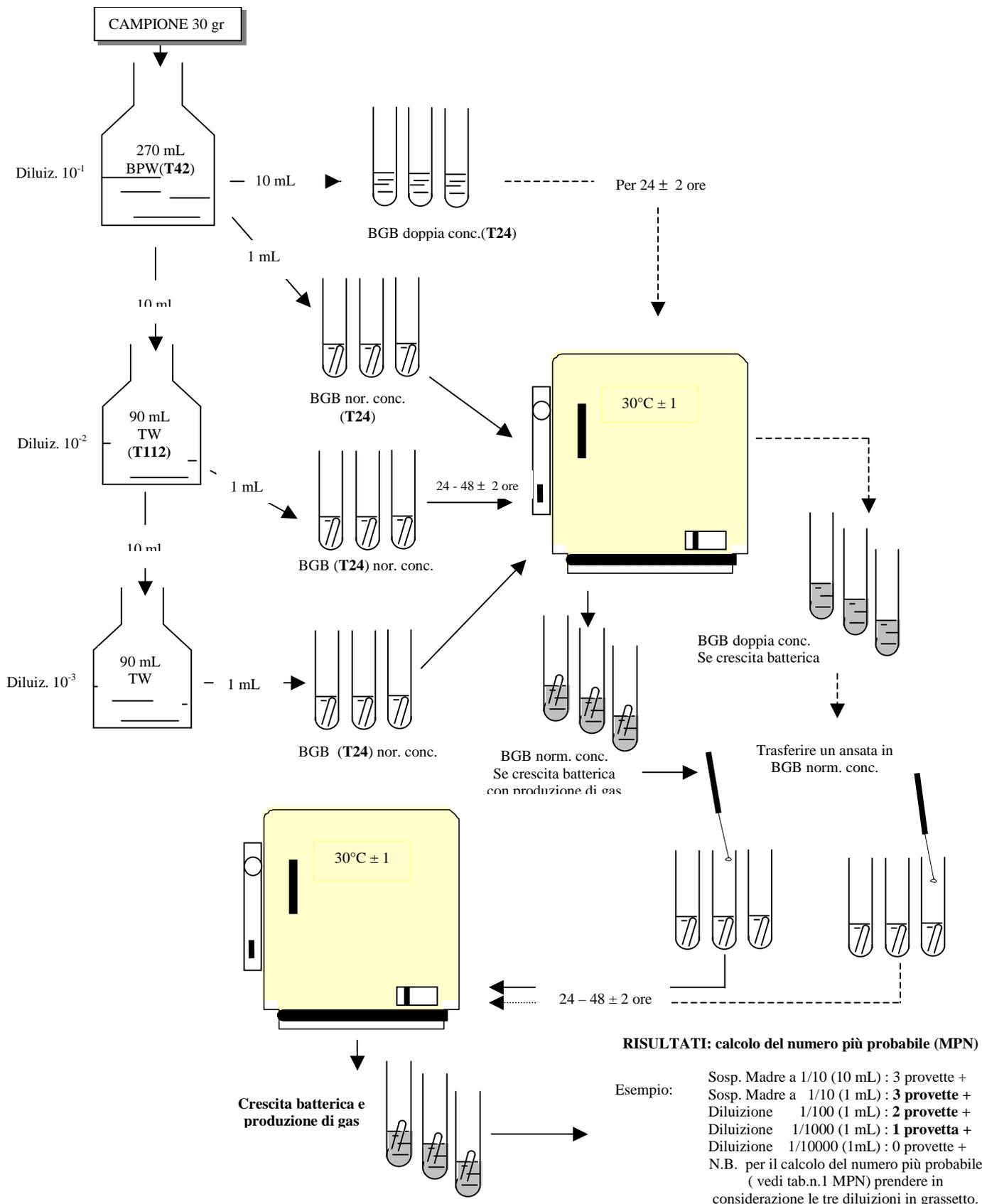
N.B.: arrotondamento: se la terza cifra è < 5 le cifre precedenti non sono modificate
se la terza cifra è ≥ 5 le cifre precedenti sono aumentate di 1 unità

1.2.3 Ricerca coliformi - Metodo UNI EN ISO 4831

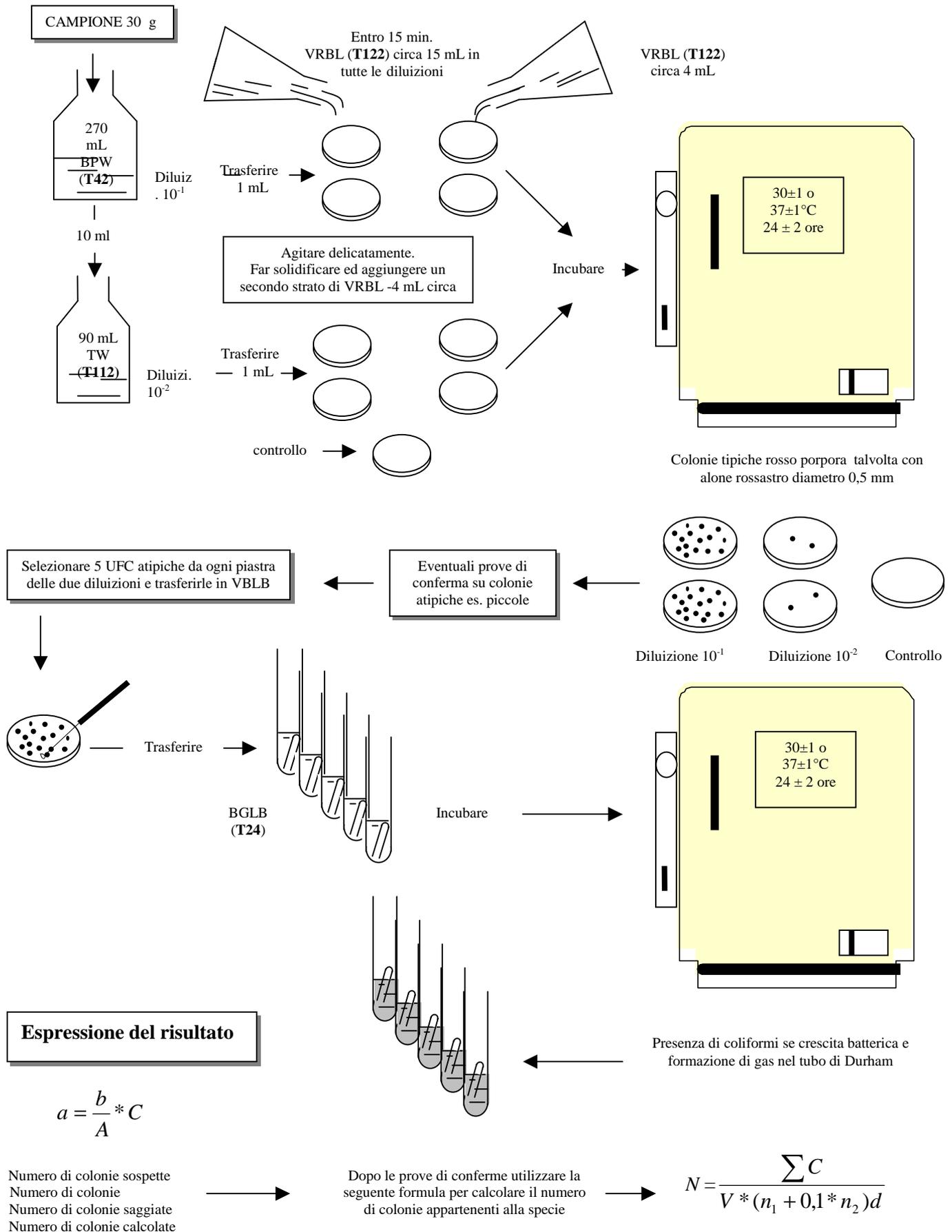
CARATTERISTICHE Famiglia enterobacteriaceae. Sono resistenti ai derivati della bile e ai coloranti trifenilmetanici. Utilizzano il Lattosio a 35-37°C
Gram – catalasi + ossidasi – riducono i nitriti a nitrati. I CF crescono a 46°C.
E. coli è betaglucuronidasi e indolo pos. Alcuni sono associati alla diarrea infantile (EPEC enteropatogeni E.coli) altri produttori di enterotossine (ETEC enterotossigeni E.coli), altri a malattie dissenteriche (EIEC enteroinvasivi E.coli).

MANIFRSTAZIONI CLINICHE Incubazione 7-12 ore (solito 12-24): dol.ori addominali febbre vomito diarrea con sangue e muco; durata 3-5 giorni.

HABITAT Larghissima diffusione ambientale suolo, acqua, animali, uomo in materie prime sia di origine animale che vegetale.



1.2.4 Ricerca coliformi - Metodo ISO 4832:2006

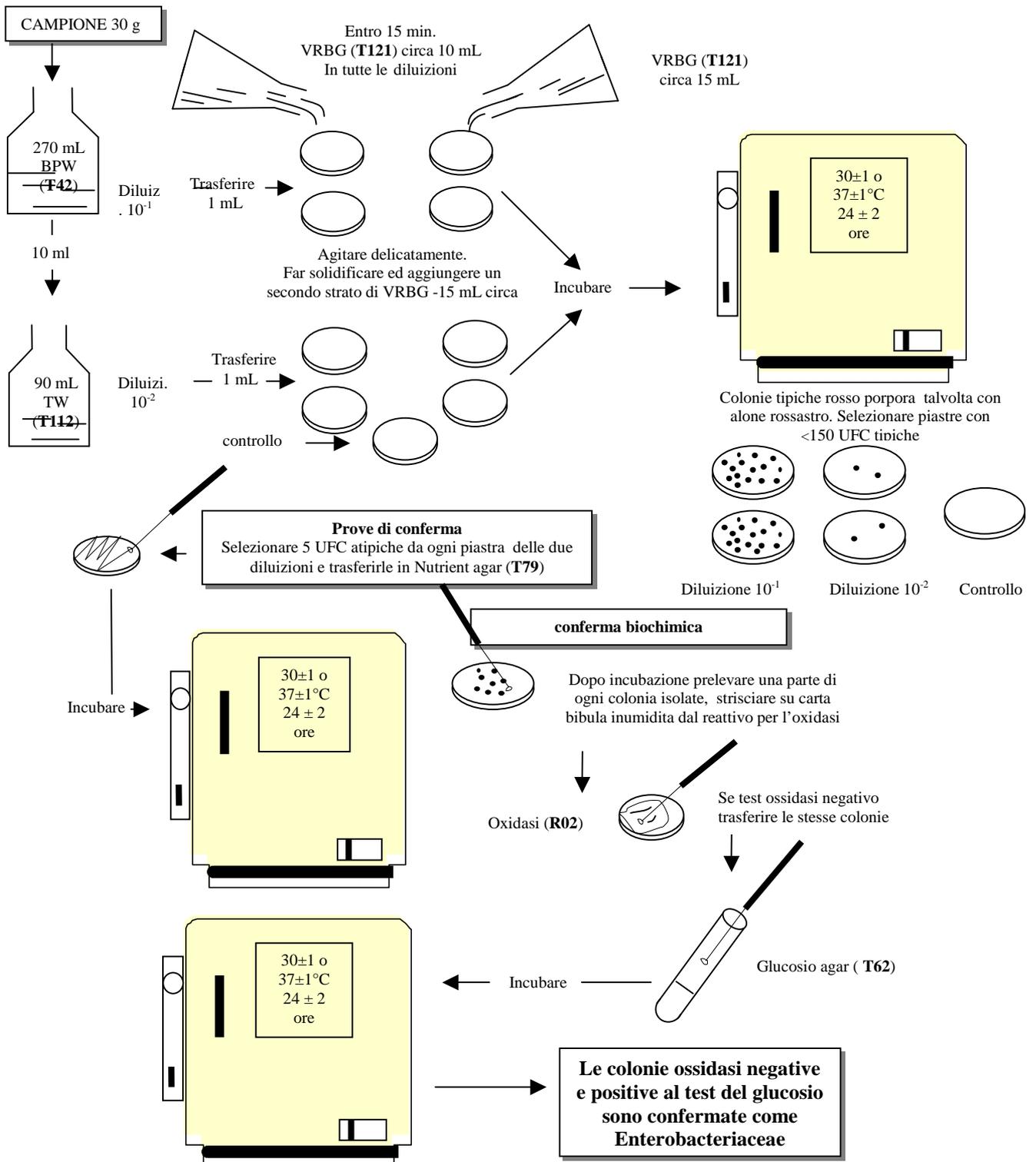


- C Numero di colonie sospette
- b Numero di colonie
- A Numero di colonie saggiate
- a Numero di colonie calcolate

- $\sum C$ somma delle colonie confermate
- V volume dell'inoculo in mL in ogni piastra
- n_1 numero delle piastre considerate per la prima diluizione
- n_2 numero delle piastre considerate per la seconda diluizione
- d fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione

1.2.5 Ricerca enterobacteriaceae – Metodo ISO 21258 – 2:2004

CARATTERISTICHE	Si riconoscono 28 generi e 90 specie. Metabolismo degli zuccheri sia respiratorio che fermentativo, sono Gram – Glucosio + con formazione di acidi e gas, ossidasi-. Riducono i nitrati in nitriti
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Sono causa di infezioni e malattie con decorso e gravità variabile secondo il genere interessato
HBITAT	Larghissima diffusione ambientale. Presenti principalmente in tutte le materie prime dell'industria alimentare. Denominati "indici di produzione" sono utili per determinare se vi è stato rispetto delle norme di buona lavorazione dei prodotti. Sono degli indici di igienicità.

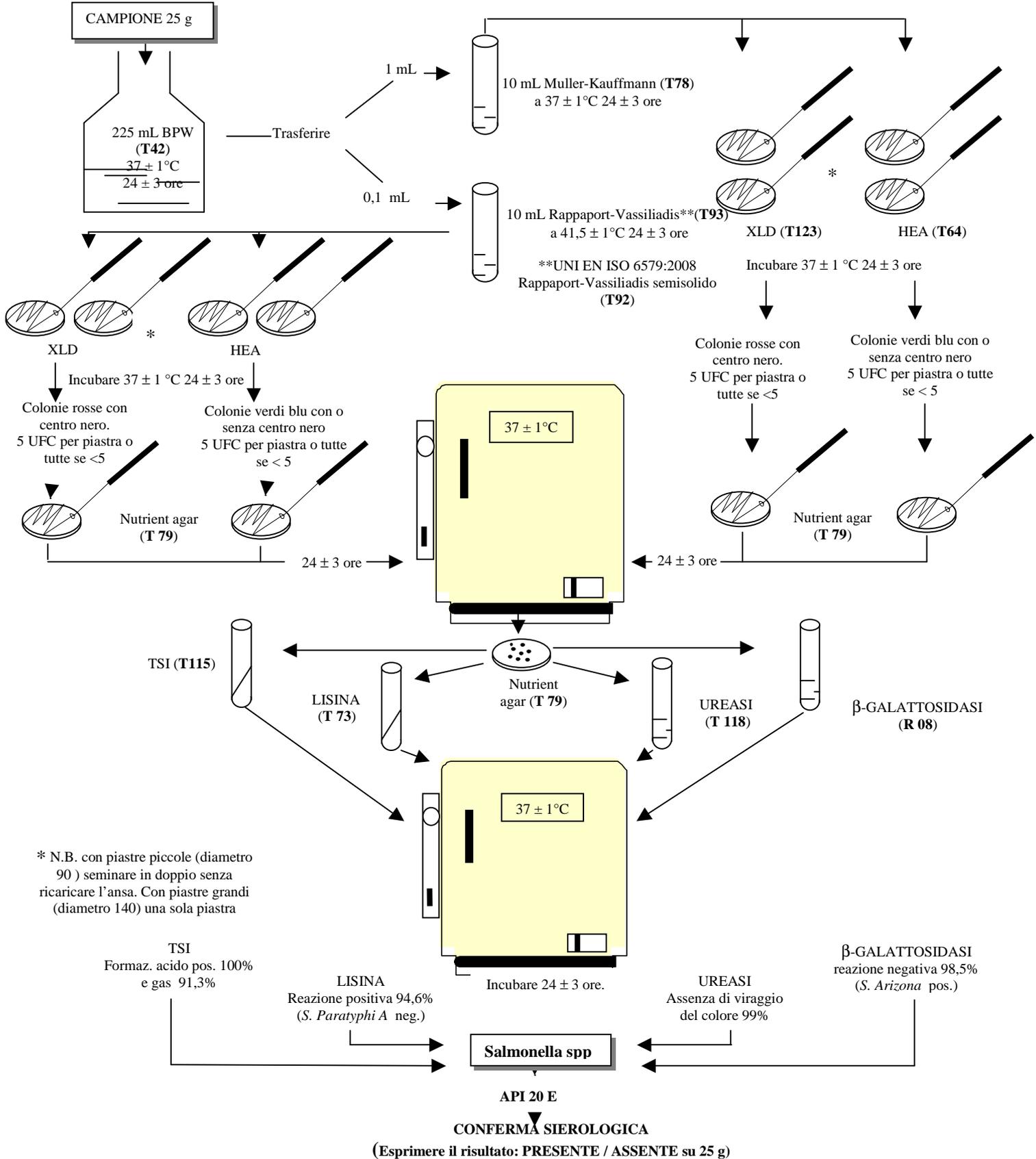


1.2.6 Ricerca di Salmonella spp - Metodo UNI EN ISO 6579: 2008

CARATTERISTICHE Gram – ossidasi – catalasi + glu. + malt. + mann. + sorb. + latt – (+) adomitolato – ureasi – indolo – (+) V.P. – Riduzione dei nitrati + crescita 35-37°C Aw 0,95-0,99 pH4,5-9

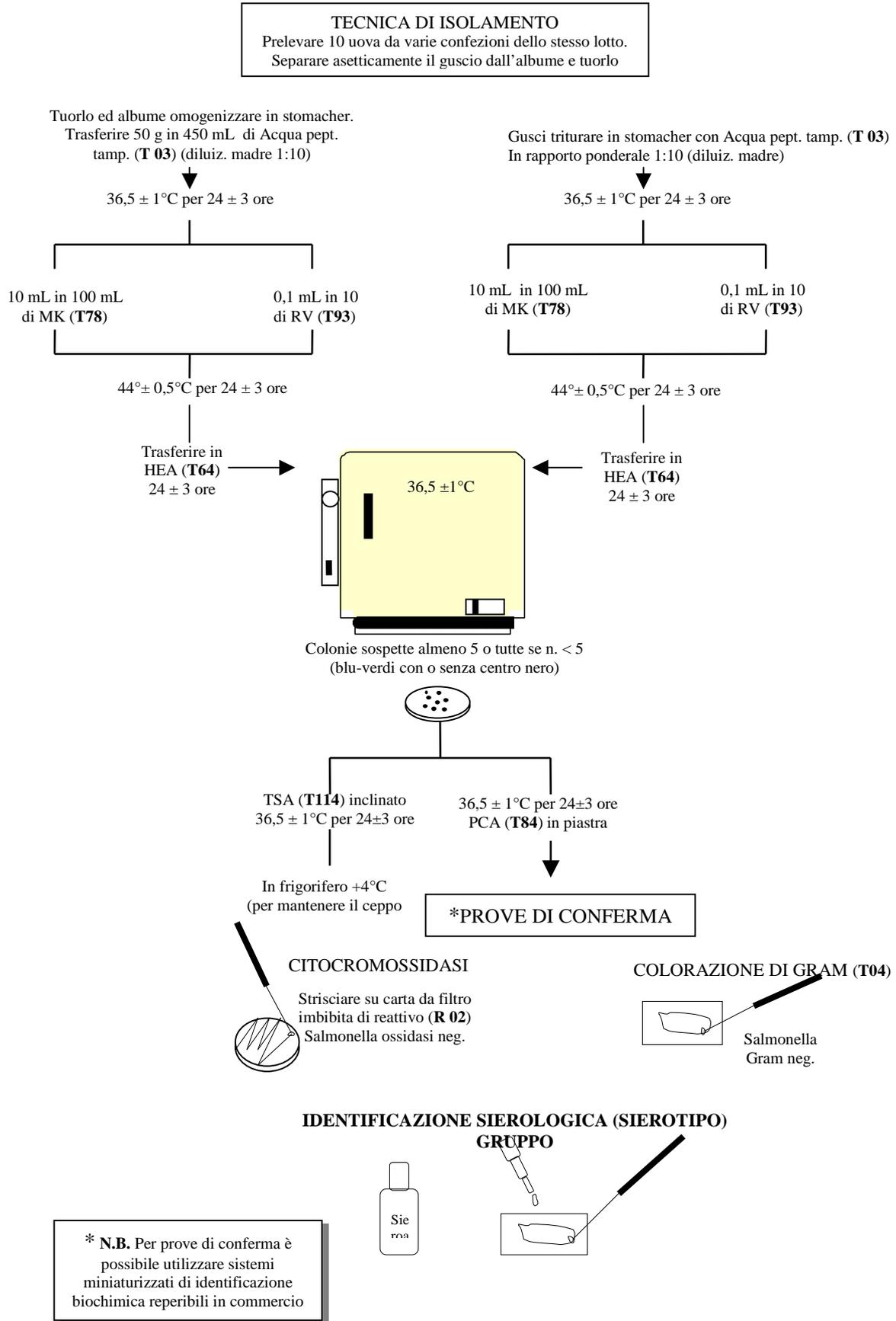
MANIFESTAZIONI CLINICHE Incubaz. 12-36 ore. Diarrea, dolori addominali, vomito, febbre. Durata da alcuni giorni a 3 settimane

ABITAT Prodotti car01nei, salumi, polli, ovo prodotti



* N.B. con piastre piccole (diametro 90) seminare in doppio senza ricaricare l'ansa. Con piastre grandi (diametro 140) una sola piastra

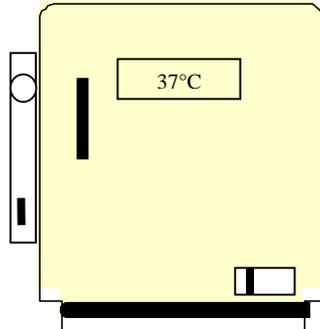
1.2.7 Ricerca di Salmonella su uova fresche - Rapporti ISTISAN 96/35



1.2.8 Ricerca di Salmonella nei molluschi - Rapporti ISTISAN 96/35

Omogenizzare 25 g di polpa di mollusco in 225 mL di
Acqua peptonata tamponata (T03)

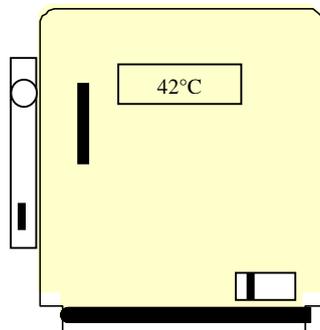
Incubare per 20 ore



Depositare 3 gocce (0.1 mL circa) in
punti separati e distanti tra loro in piastra
con MSR/V (T92) effettuare 2 repliche



Incubare le piastre senza rovesciarle
per 20-24 ore



Osservare intorno alle gocce aloni di crescita di grosse
dimensioni. Aloni ristretti (diametro <1.5 cm) escludono
la presenza di salmonelle mobili

Procedere ad accertamento rapido sul materiale più esterno
dell'alone con il test di agglutinazione al lattice con sieri anti-H
Si possono usare per l'accertamento metodi equipollenti
reperibili in commercio

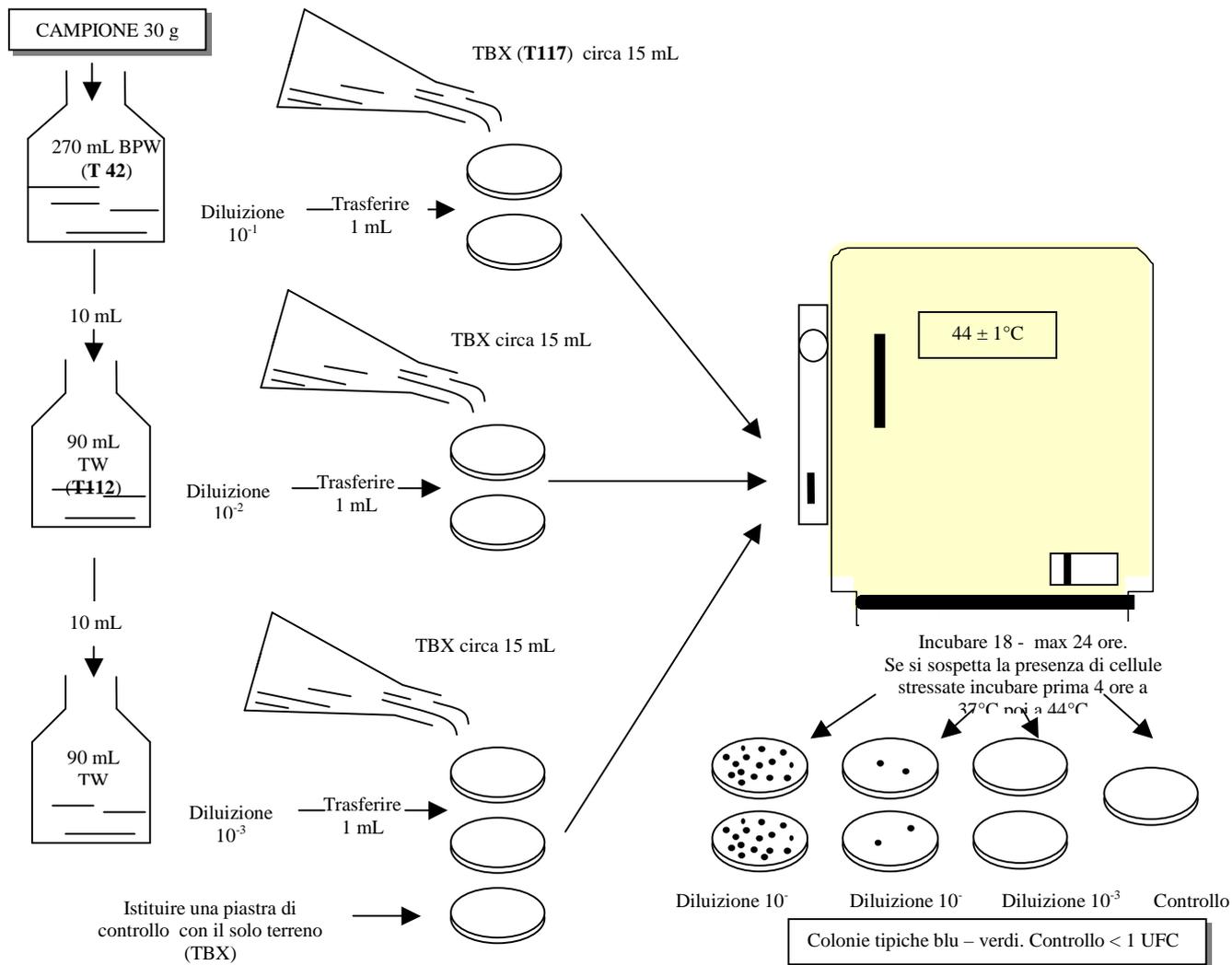
ESPRESSIONE DEI RISULTATI
Presenza/Assenza di Salmonella in 25 g

1.2.9 Ricerca *Escherichia coli* - Metodo ISO 16649 – 2:2001 (*Escherichia coli* β-glucuronidasi-positivo)

CARATTERISTICHE Famiglia enterobatteriace resistenti derivati della bile e coloranti trifenilmetanici. Lattosio + Gram – ossidasi- Catalasi+ riducono i nitriti a nitriti. L'*E. coli* aerobio e anaerobio facoltativo non sporigeno cresce a 44±1°C indolo + β-D-glucuronidasi + (eccezz. sierotipi 0157:H7) associato alla diarrea infantile (EPEC enteropatogeni *E.coli*) produttori di enterotossine (ETEC enterotossigeni *E.coli*), malattie dissenteriche (EIEC enteroinvasivi *E.coli*) E' indicatore di inquinamento fecale

MANIFESTAZIONI CLINICHE Incubaz. 7-12 ore (solito 12-24); dolori addominali, vomito, diarrea con sangue e muco. Durata 3-5 giorni

HABITAT Larga diffusione nell'ambiente, suolo, acque, animali, uomo in materie prime sia di origine animale che vegetale.



1 Con minimo 10 UFC calcolare

$$UFC / g - ml = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

2 Con meno 10 UFC calcolare

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot n \cdot d}$$

3 Se UFC tipiche assenti

→ < 1/d

4 Se d₁ > 300 UFC tipiche e d₂ < 300 non tipiche

→ < 1/d₂ ma > 1/d₁

5 Se d₁ > 300 UFC tipiche e non e d₂ < 300 non tipiche

→ < 1/d₂

6 Se UFC in d₁ è tra 150 e 167

→ applicare formula generale

7 Se d₁ è > 167 considerare d₂

→ applicare formula 2

8 Se > 150 UFC tipiche in tutte le diluiz. → di 150/d UFC dove d= ultima dil.

9 Se > 150 UFC tipiche solo nella più bassa diluiz. → applicare formula 2

ΣC somma delle colonie confermate
V volume dell'inoculo in mL in ogni piastra
n₁ numero delle piastre considerate per la prima diluizione
n₂ numero delle piastre considerate per la seconda diluizione
d fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione

N:B: l'espressione del risultato differisce leggermente dalle indicazioni della ISO 7218:2001

1.2.10 Ricerca *Yersinia enterocolitica* - Rapporti ISTISAN 96/35

CARATTERISTICHE

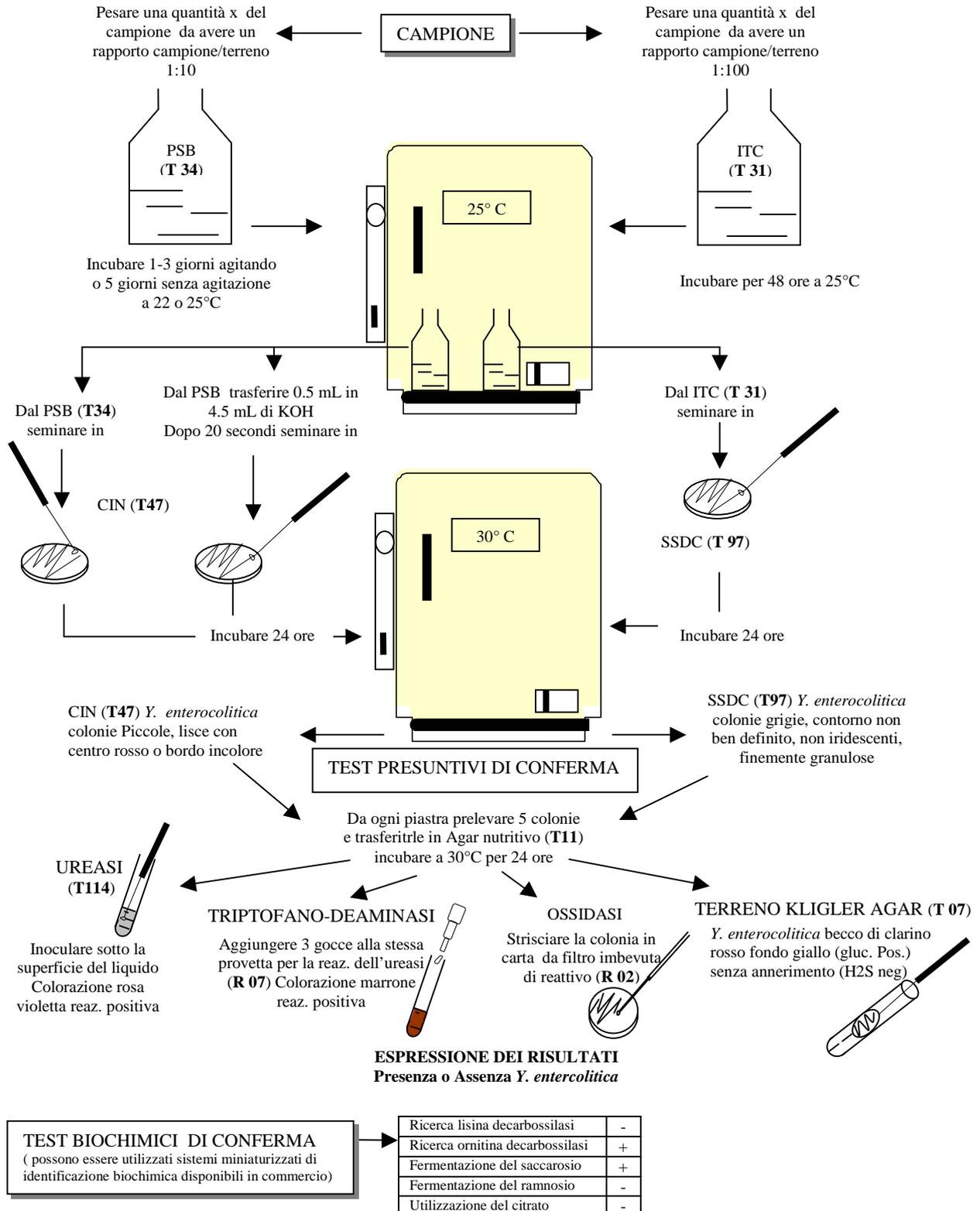
Stesse caratteristiche delle enterobacteriaceae. Gram- Riduce i nitriti enterotossina termostabile e ac. Resistente pH 5 – 9 (7,7 – 7,8). Immobile a 37°C mobile a 25°C (*Y. pestis* immobile). Temperatura di inattivazione 60°C 1 – 3 minuti. Resistente NaCl fino al 5%. Ureasi + Glucosio + lattosio – esculina – gas da glucosio-, H₂S -:

MANIFESTAZIONI CLINICHE

Sintomatologia talvolta simile a salmonella. Diarrea liquida o pastosa o purulenta maleodorante. Sintomi incostanti: febbre, dolori addominali, vomito.

HABITAT

Carne di maiale. Manzo. Pollame. Latte.Uova. Riso. Pesce.carote



1.2.11 *Listeria monocytogenes* - Rapporti ISTISAN 96/35 (negli alimenti escluso latte e derivati)

CARATTERISTICHE

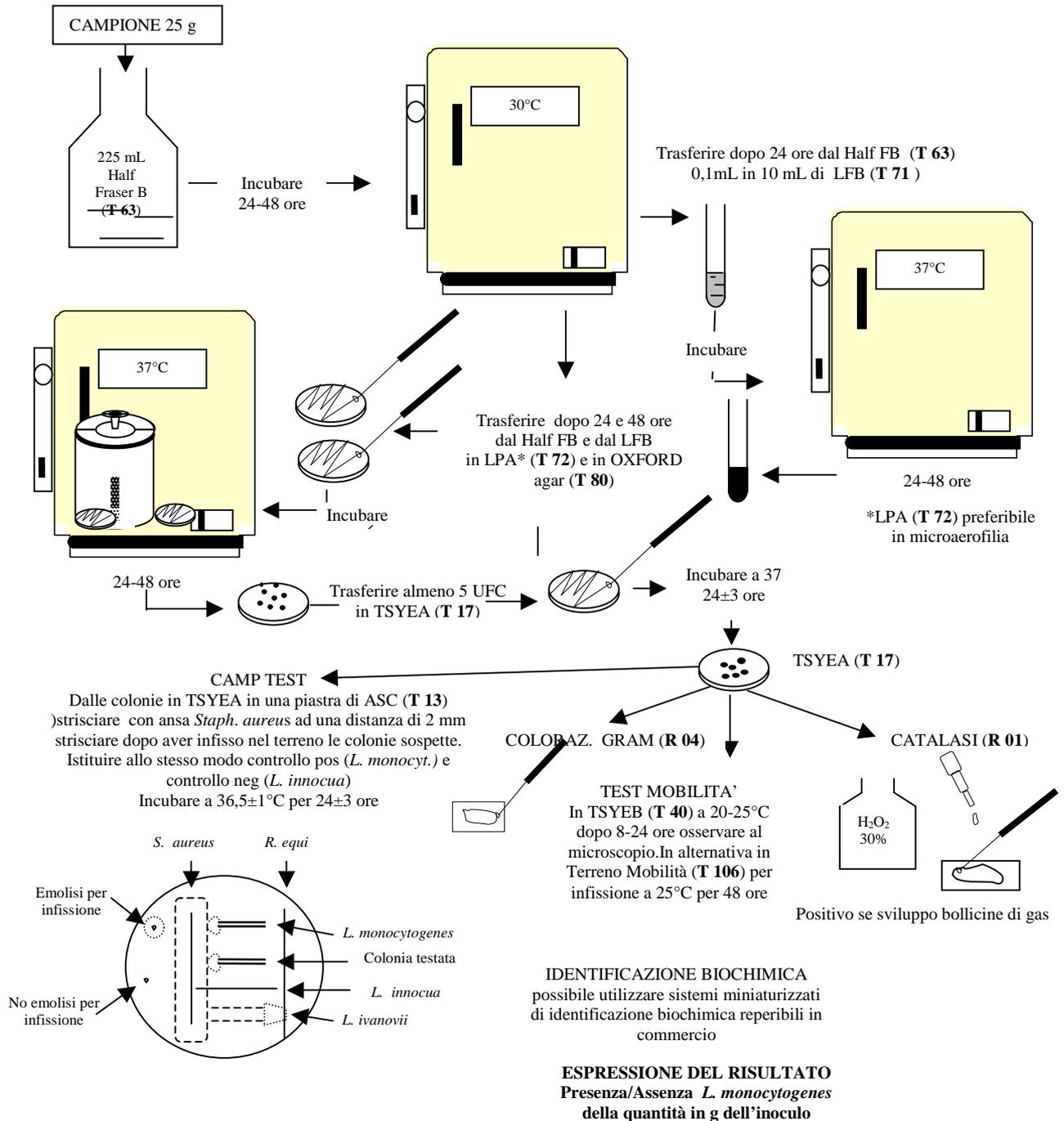
Catalasi + Gram + aerobio non sporigeno mobile. Produce beta emolisina
Mannitolo- Xilosio- Ramnosio+ Non idrolizza l'urea non produce H₂S in TSI
Ossidasi- Temp. 30-37°C (1-45°C) pH 6-9 (pH <5.5 non sopravvive)

MANIFESTAZIONI CLINICHE

Sintomatologia simile all'influenza, disturbi cerebrali talvolta accompagnati da Da setticemia. Pericolosa per donne gravide

HABITAT

Latte, formaggi, verdure. Carni con risultati però non sempre concordi.



1.2.12 *Listeria monocytogenes* - Rapporti ISTISAN 96/35 (nel latte e derivati)

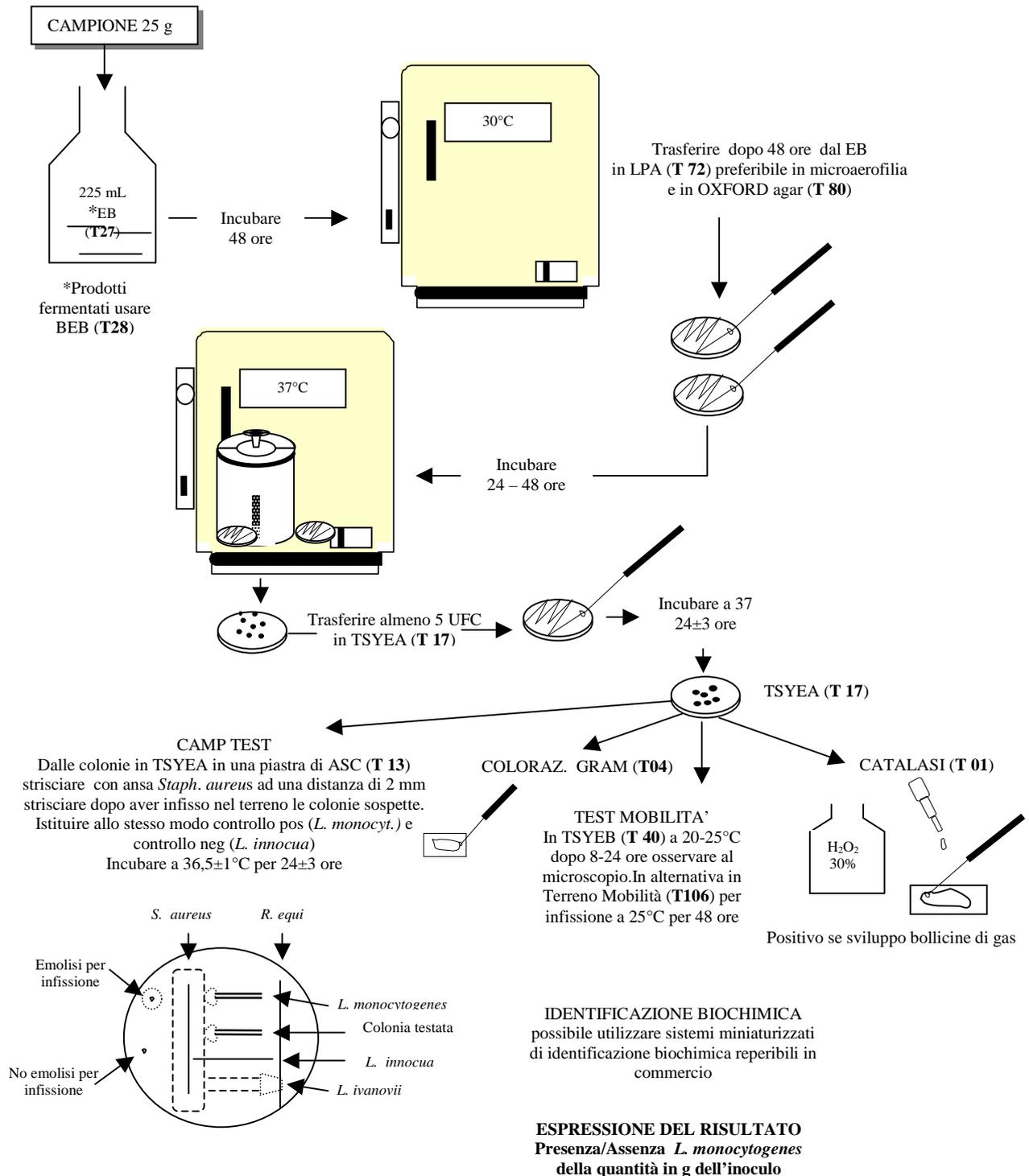
LATTE IN POLVERE E SIERO IN POLVERE: agitare fino a dissoluzione

FORMAGGIO E CASEINA: aggiungere al terreno dopo averlo portato a 45°C ed omogeneizzare

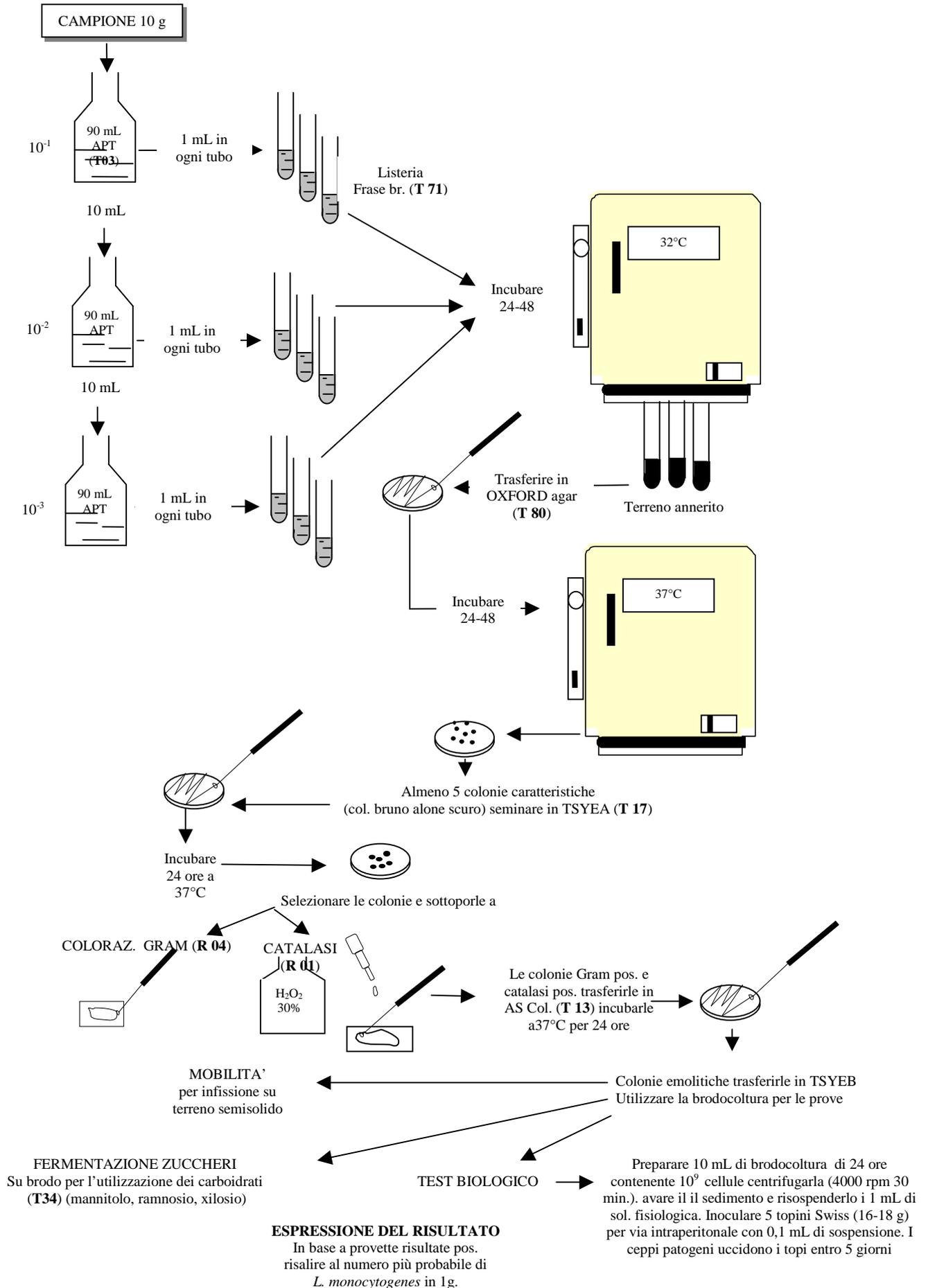
BURRO: dopo aver fuso in campione trasferire con pipetta riscaldata a 45 °C e mescolare

GELATI E PRODOTTI LATTIERI CONGELATI: fondere il campione e mantenere in bagnomaria a 37°C

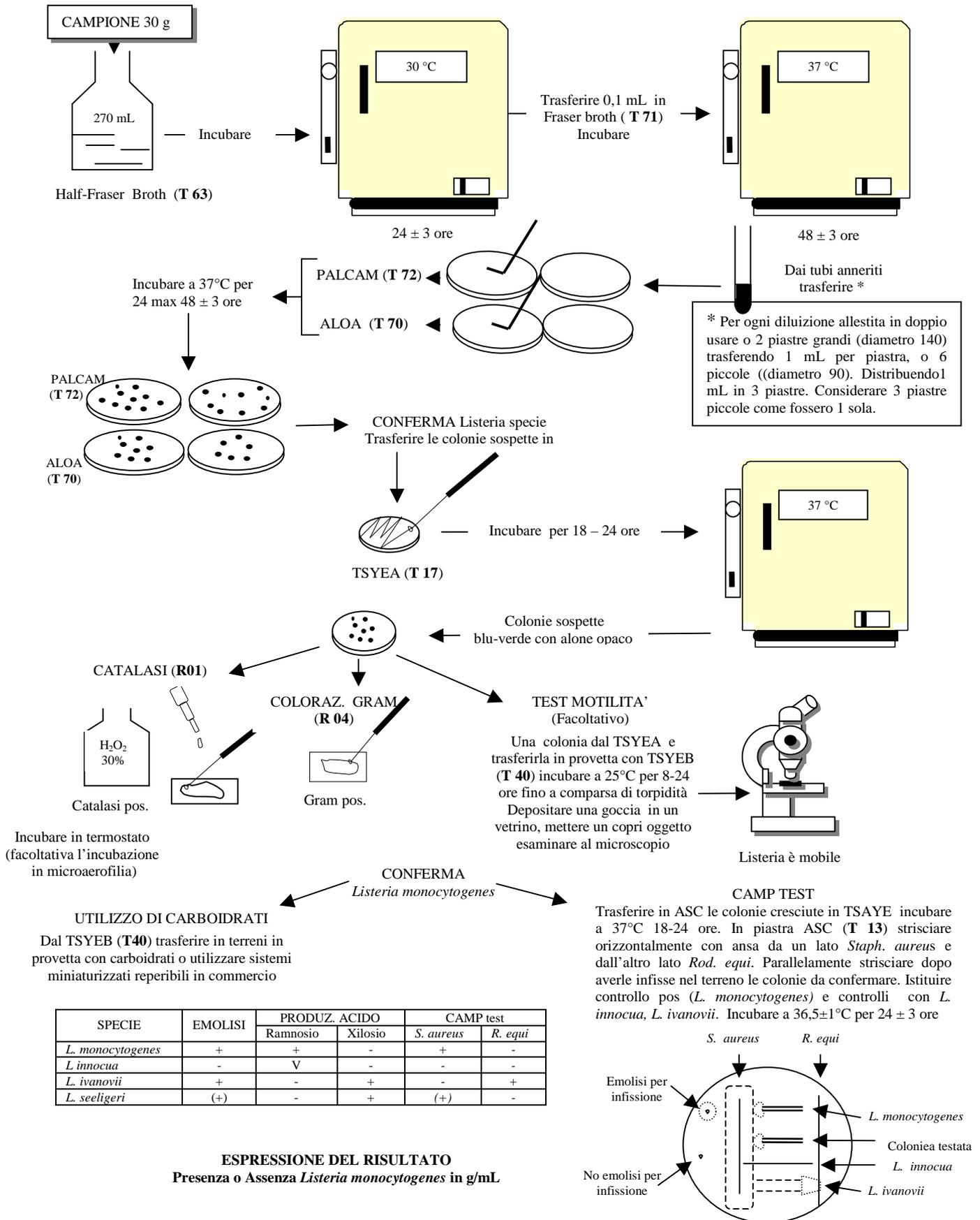
LATTI FERMENTATI, YOGURT, CREME, DESSERT: eseguire l'omogenizzazione in flaconi con palline di vetro.



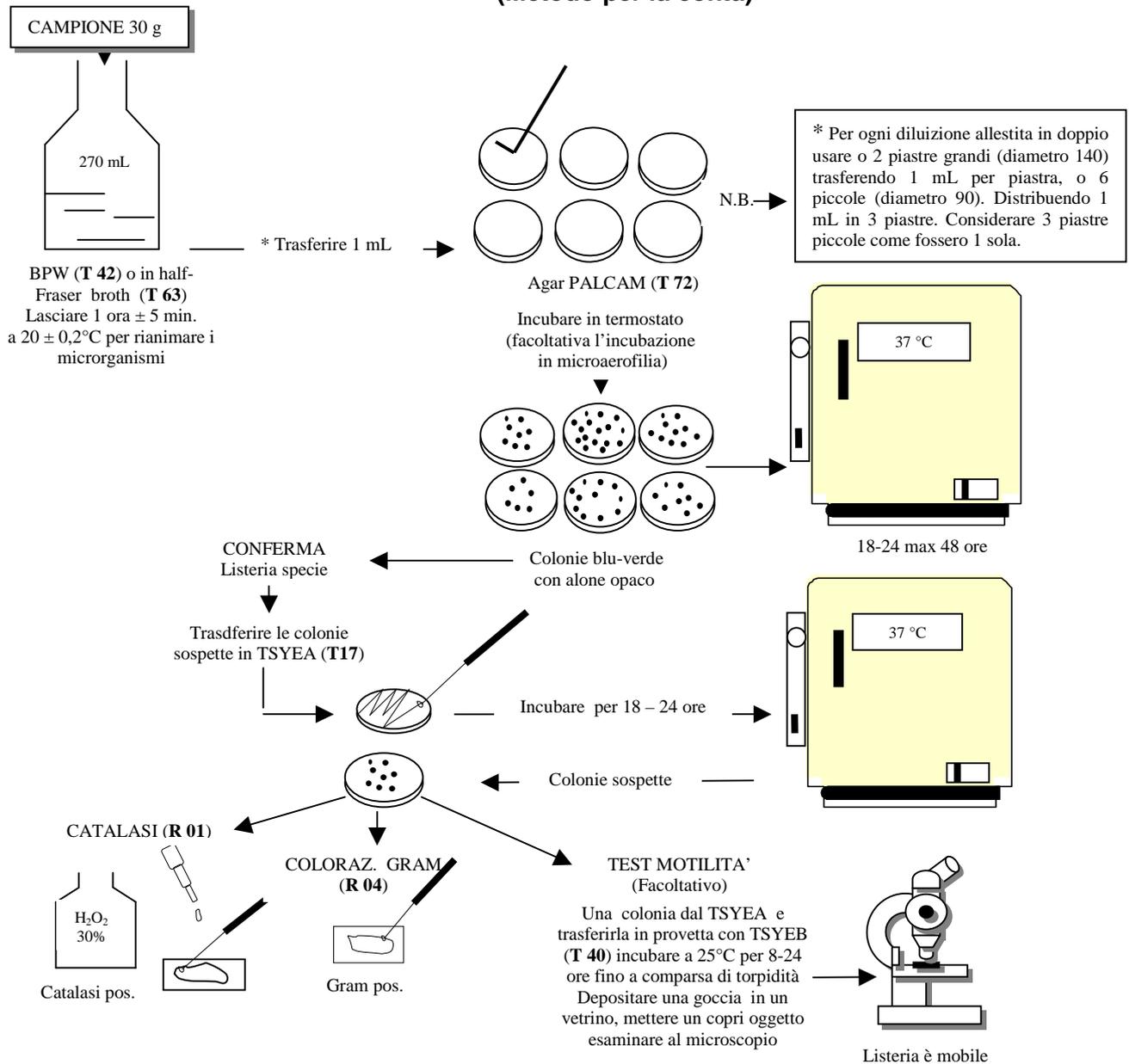
1.2.13 Numerazione di *Listeria monocytogenes* - Rapporti ISTISAN 96/35



1.2.14 *Listeria monocytogenes* - UNI EN ISO 11290-1:2005



1.2.15 *Listeria monocytogenes* - UNI EN ISO 11290-2:2005 (Metodo per la conta)



* Per ogni diluizione allestita in doppio usare o 2 piastre grandi (diametro 140) trasferendo 1 mL per piastra, o 6 piccole (diametro 90). Distribuendo 1 mL in 3 piastre. Considerare 3 piastre piccole come fossero 1 sola.

UTILIZZO DI CARBOIDRATI

Dal TSYEB trasferire in terreni in provetta con carboidrati o utilizzare sistemi miniaturizzati reperibili in commercio

SPECIE	EMOLISI	PRODUZ. ACIDO		CAMP test	
		Ramnosio	Xilosio	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-

ESPRESSIONE RISULTATI

1 - Calcolare per ciascuna piastra il n. di colonie di *L. monoc.* con la formula:

$$a = \frac{b}{A} * C$$

2 - Se piastre con < 150 colonie di *L. monoc.* e una < 15 colonie di *L. monoc.*:

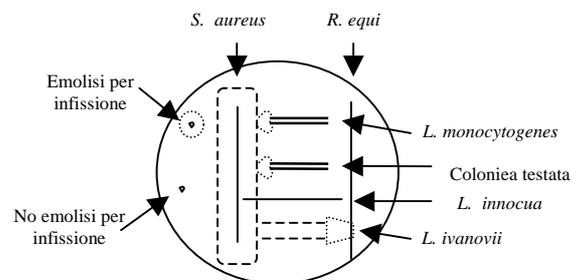
$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

3 - Se due piastre della prima diluiz. >15 colonie applicare formula 1

4 - se nelle due piastre della prima diluiz. colonie assenti : $\frac{1}{d * V}$

CAMP TEST

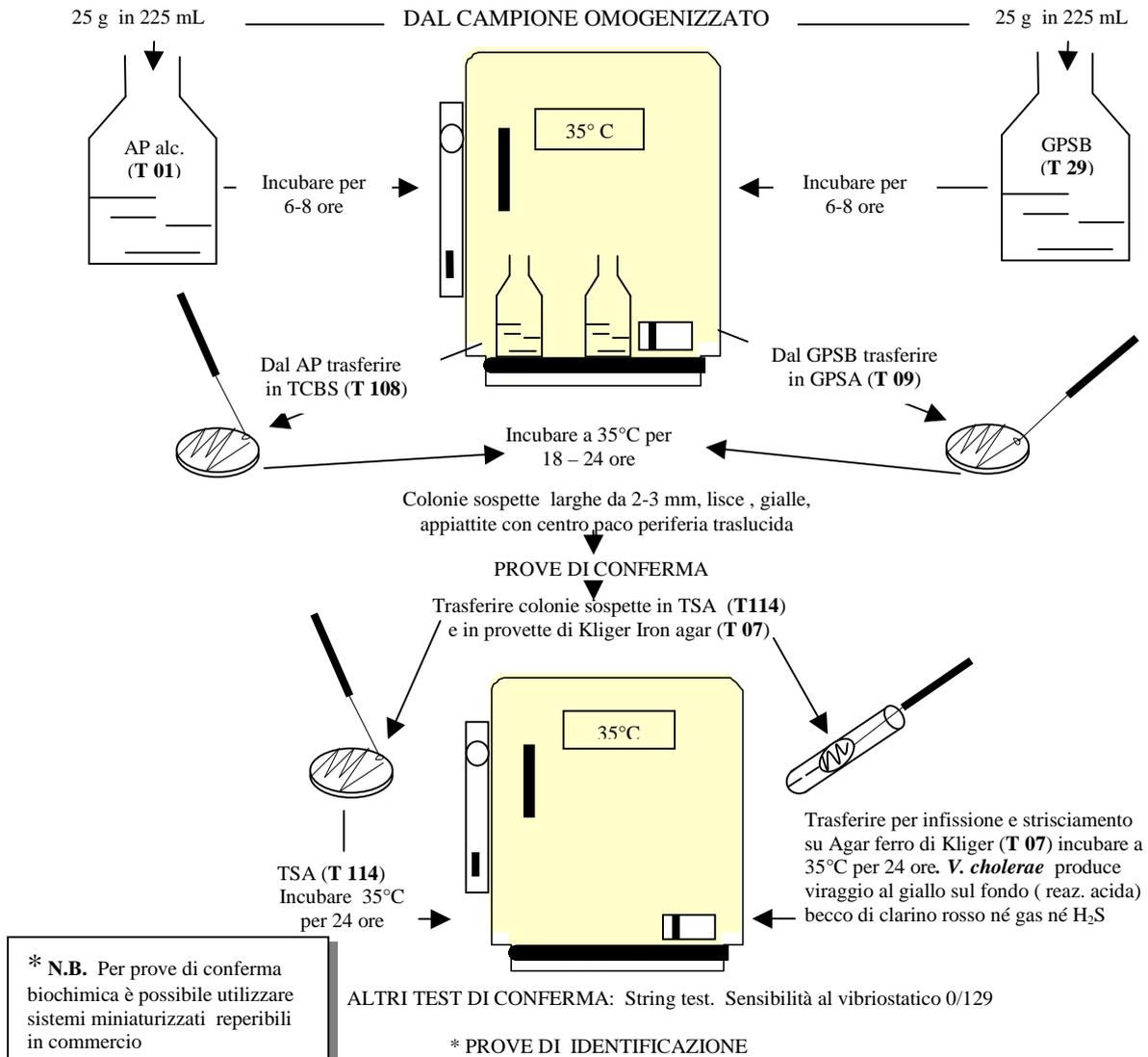
Trasferire in ASC le colonie cresciute in TSYAE incubare a 37°C 18-24 ore. In piastra ASC (T 13) strisciare orizzontalmente con ansa da un lato *Staph. aureus* e dall'altro lato *Rod. equi*. Parallelamente strisciare dopo averle infisse nel terreno le colonie da confermare. Istituire controllo pos (*L. monocytogenes*) e controlli con *L. innocua*, *L. ivanovii*. Incubare a 36,5 ± 1°C per 24 ± 3 ore



1.2.16 Ricerca del *Vibrio cholerae* - Rapporti ISTISAN 96/35

CARATTERISTICHE	Gram – di forma incurvata, non sporigeno, mobile, aerobio o anaerobio facoltativo. Cresce optimum 37°C pH 6.9 – 9 concentrazione NaCl 0% - 3%. Ossidasi + glucosio + mannitolo + saccarosio+ lattosio – arabinosio – lisina ed ornitina decarbossilasi + arginino deidrati – catalasi +
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Il colera è una malattia grave. Insorgenza improvvisa, diarrea profusa acquosa, vomito, disidratazione, acidosi e collasso circolatorio. Incubazione da alcune ore a 5 giorni (solito 2-3)
HABITAT	Acqua contaminata. Molluschi

Campione non inferiore a 200 g. mantenuto a 2 - 4°C dal prelievo alle analisi che devono essere eseguite entro 6 ore. Se trattasi di molluschi vanno lavati con acqua distillata, aperto il guscio sterilmente e prelevato il tutto, compreso il liquido intervallare. Pesare 100 g del campione e omogenizzare



* **N.B.** Per prove di conferma biochimica è possibile utilizzare sistemi miniaturizzati reperibili in commercio

Test Biochimici principali			Reazioni biochimiche del <i>Vibrio cholerae</i>			
			Test	Reaz. pos	Reaz. neg	<i>V. cholerae</i>
Ossidasi	+	100	H ₂ S /Kligler)	Annerimento	Ass.	-
Utilizzazione del citrato	+	74	Prod. gas	Soll. o rott. Ter.	Ass. soll. o rott.	-
Utilizzazione D-mannitolo	+	99.8	Destrosio	Giallo	Porpora	+
Utilizzazione meso-inositolo	-	0	Mannitolo	Giallo	Porpora	+
Decarbossilazione L-lisina	+	100	Inositolo	Giallo	Porpora	+
Decarbossilazione L-ornitina	+	99.2	Decarbossilazione llisina	Porpora	Giallo	+
Decarbossilazione L-arginina	-	0	Decarbossilazione arginina	Porpora	Giallo	-
			Decarbossilazione ornitina	Porpora	Giallo	+

IDENTIFICAZIONE SIEROLOGICA
 Prove di agglutinazione con sieri polivalenti, sieri anti-Inaba e anti-Ogawa

ESPRESSIONE DEL RISULTATO
 Presenza o Assenza *V. cholerae*

1.2.17 Ricerca del *Vibrio parahaemolyticus* - Rapporti ISTISAN 96/35

CARATTERISTICHE

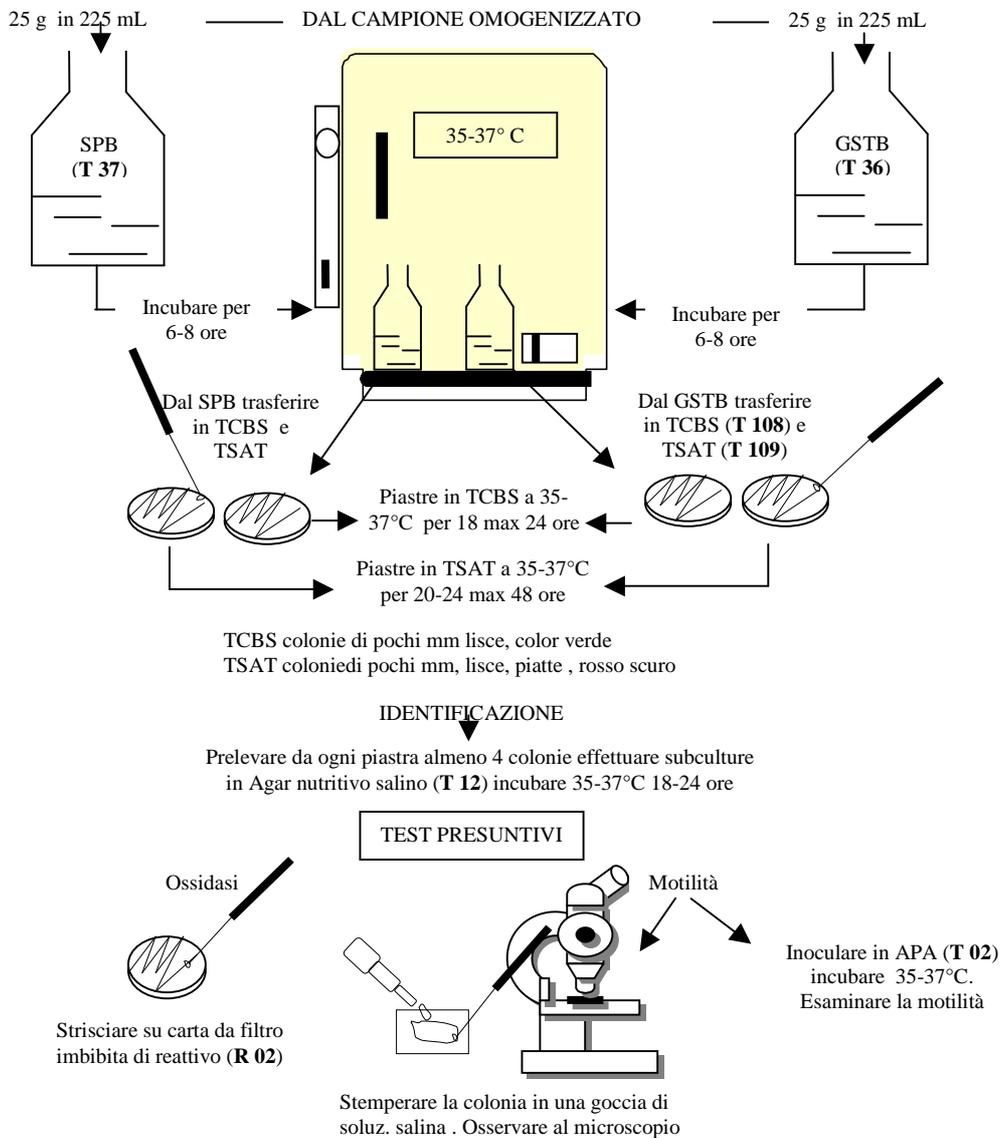
Gram – ossidasi + lattosio – mannitolo + lisina e ornitina decarbossilasi
+ arginina deidrati – arabinosio + (-). Alofilo

MANIFESTAZIONI CLINICHE

Incubazione 12 – 24 ore. Doliori addominali, vomito, diarrea, disidratazione, febbre. Durata della malattia 1 – 7 giorni

HABITAT

Prodotti ittici crudi e cotti. Pesci, molluschi, acque



TEST BIOCHIMICI (E' possibile usare sistemi miniaturizzati reperibili in commercio)

<i>V. parahaemolyticus</i> reazioni biochimiche			
Saccarosio	-	H ₂ S	-
Ossidasi	+	Crescita aero-anaerobiosi	+
Motilità	+	Decarbossilasi lisina	+
Glucosio	+	Produzione di indolo	+
Formaz. di gas dal gluc.	-	β-galattosidasi	-
Lattosio	-		

ESPRESSIONE DEL RISULTATO
Presenza o Assenza *V. parahaemolyticus*

1.2.18 Ricerca *Campylobacter* termoresistente - Rapporti ISTISAN 96/35

CARATTERISTICHE

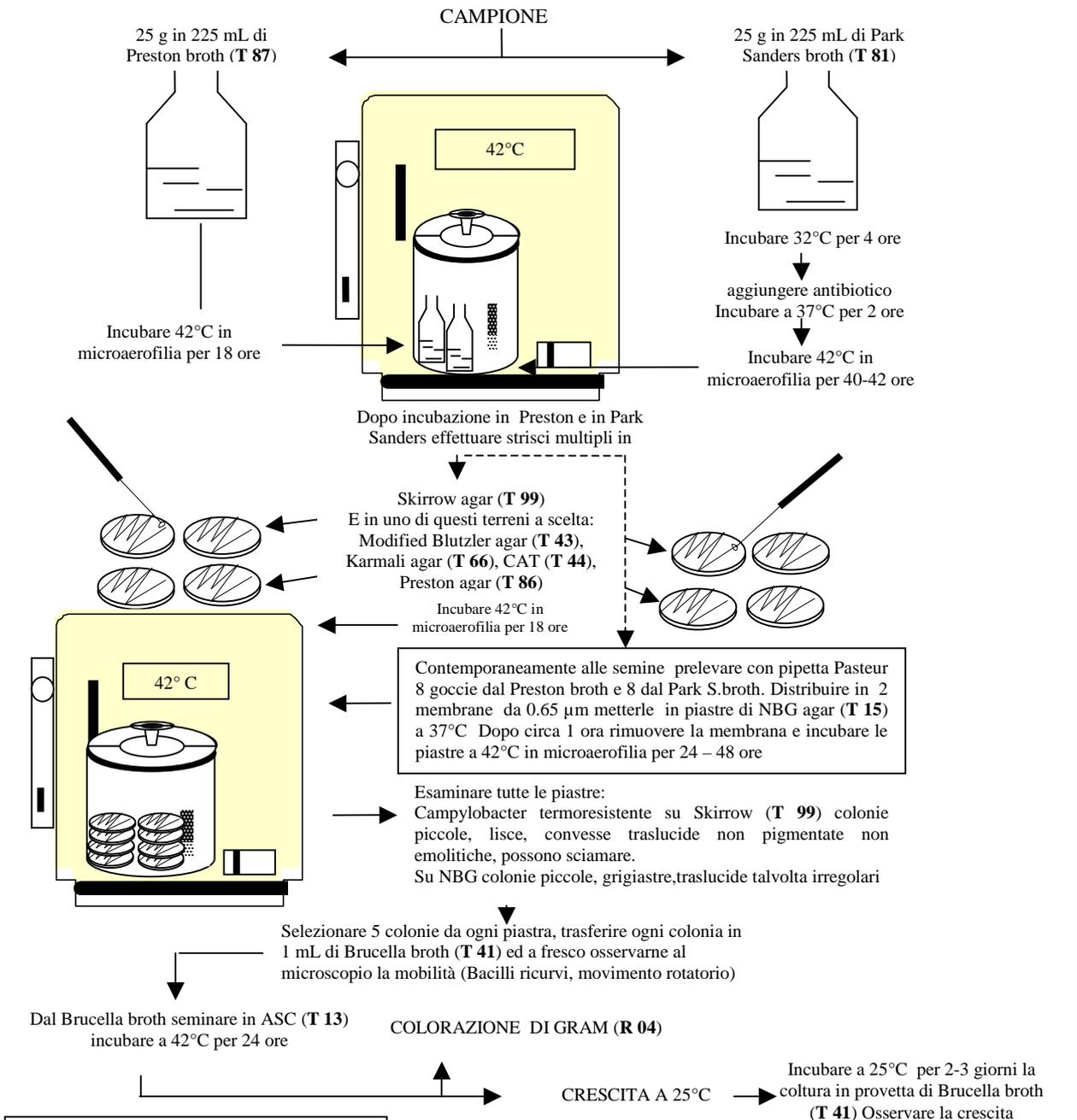
Bacilli a forma elicoidale o incurvata (ad S o ali di gabbiano). Ne esistono 5 specie con sottospecie. Gram-ossidasi + catalasi + (i catalasi neg. non sono patogeni). Mobili alosensibili termofili (quelli di interesse pratico) aerobi/microaerofili, non utilizzano i carboidrati né per via fermentativa né per via ossidativi. Il *C. jejuni* cresce a 42°C, il *C. fetus* a 25°C

MANIFESTAZIONI CLINICHE

C. jejuni/coli predomina diarrea profusa ed acquosa maleodorante, dopo 2 – 3 giorni talvolta sangue e pus, muco. Ipertermia, mal di testa dolori addominali. Il *C. fetus*-sottospecie fetus provoca forme setticemiche con ipertermia.

HABITAT

Latte crudo, carne del pollame



TEST BIOCHIMICI DI CONFERMA

(possono essere utilizzati sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio)

Reazione all'ossidasi
Utilizzazione degli zuccheri
Reazione della catalasi
Testsensibilità all'acido nalidixico e alla cefalotina
Idrolisi dell'ippurato

CAMPYLOBACTER TERMORESISTENTI SPECIE DI PIU' FREQUENTE RISCONTRO

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

*Leggero sviluppo nell'acqua di sineresi dopo 5 giorni

ESPRESIONE DEI RISULTATI

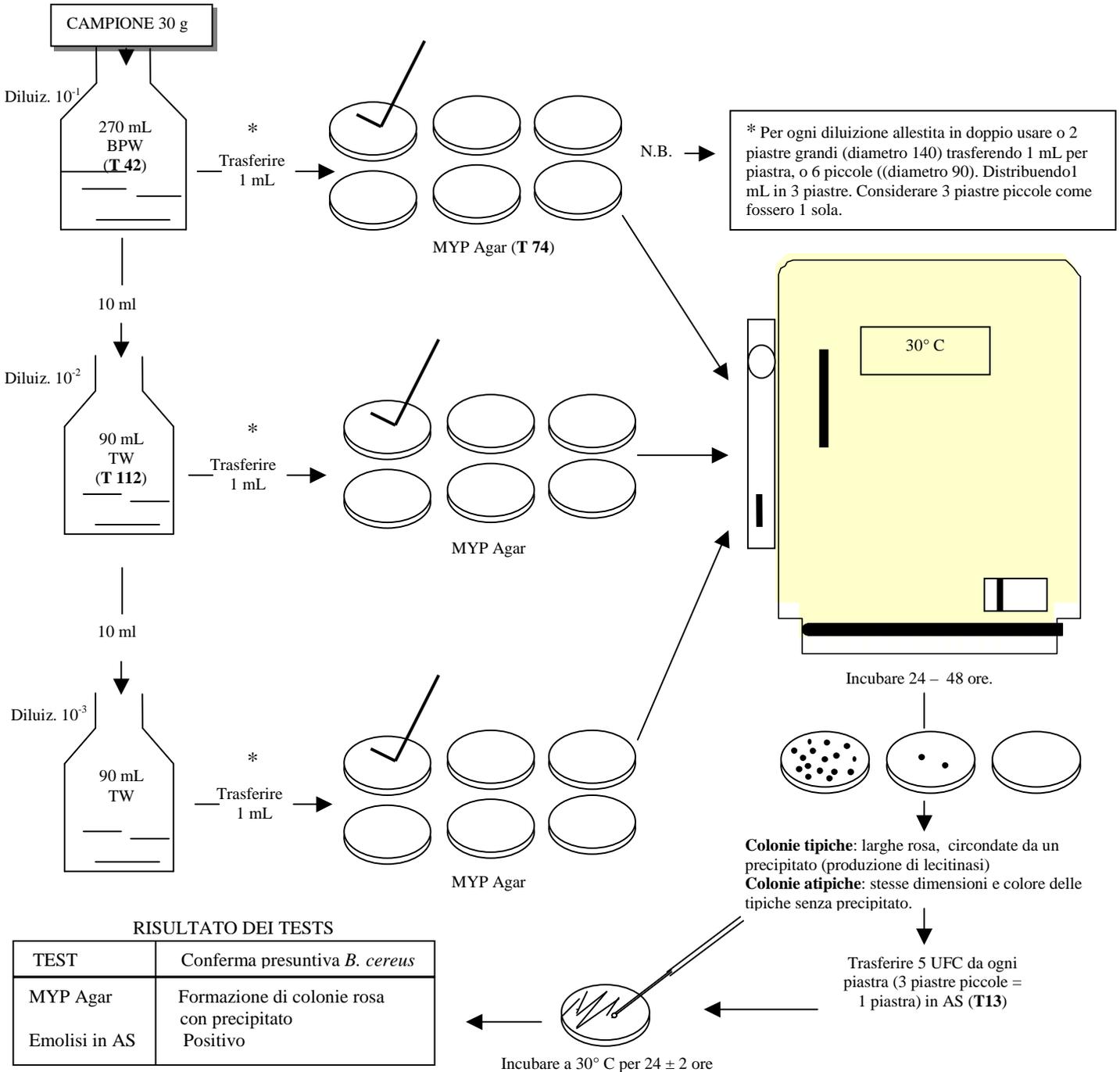
Presenza o Assenza *C. termoresistente*

1.2.19 Metodo orizzontale per la conta di *Bacillus cereus* presunto Metodo UNI EN ISO 7932:2005

CARATTERISTICHE Gram + catalasi + gluc. + malt. + glic + mannit. – latt. – arab. – mobile anaerobio facol. Riduce i nitrati liquefa la gelatina. Emolitico aw 0,93-0,95 pH4,3-9,3 temp. 18-43°C(esistono psicofili) Produce tossina emetica ed enterotossina.

MANIFESTAZIONI CLINICHE Forma gastro-intestinale (S. diarroica – S. emetica) Incubazione 6-16 ore (1-6) diarrea acuta crampi addominali. Attacco acuto nausea, vomito diarrea contenuta. Durata non più di 24 ore

HABITAT Insalate, purè, minestre di verdure, riso.

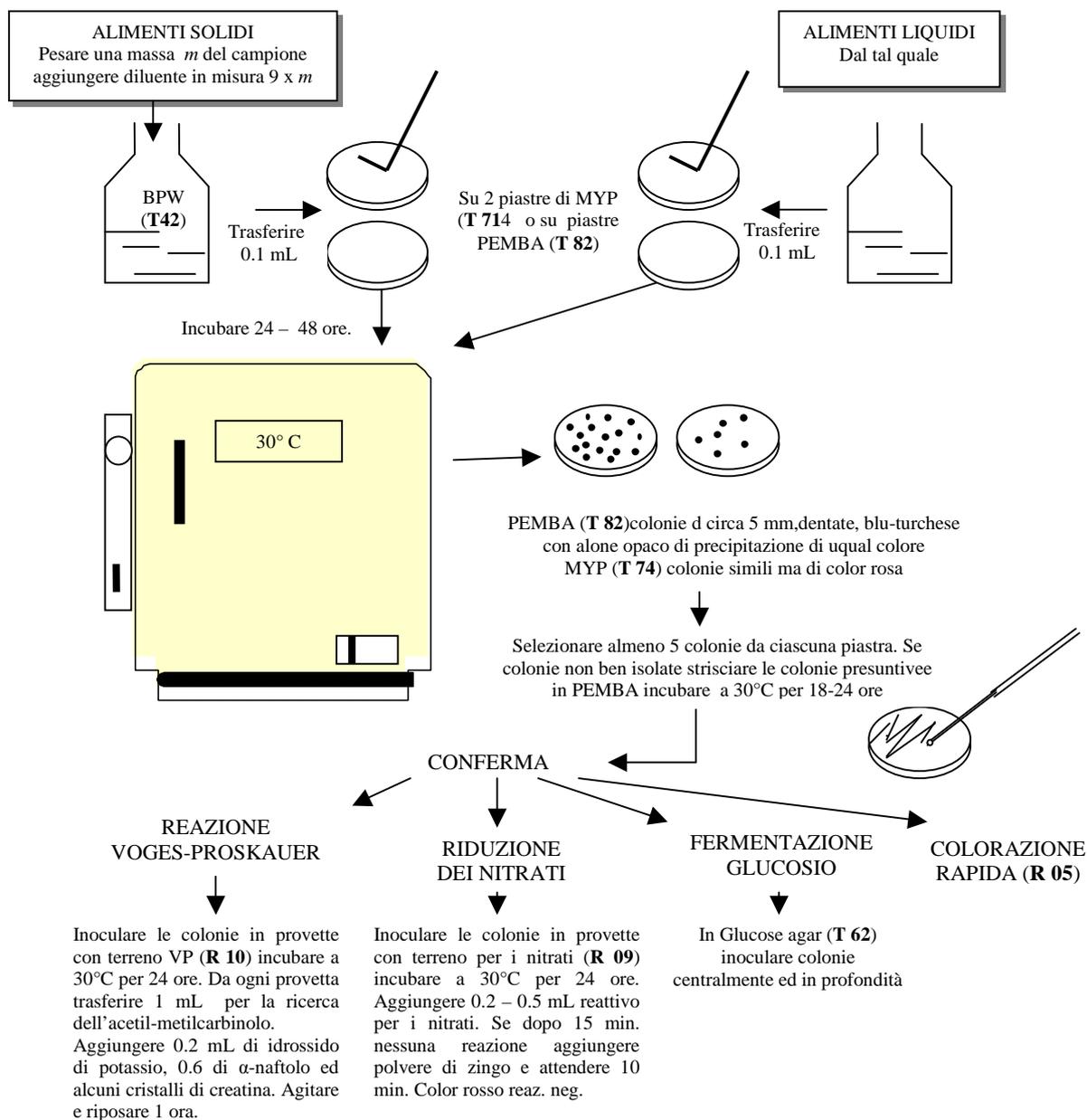


ESEMPIO:

Diluz.	UFC contate	Testate	Positive	Risultato
10 ⁻¹	65	5	5	65
10 ⁻¹	85	5	3	51
10 ⁻²	3	3	3	3
10 ⁻²	7	5	4	6

$65 + 51 + 3 + 6 = 568$ arrotondato $5,7 \cdot 10^2$ UFC
 $\frac{568}{1(2+0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}}$

1.2.20 Numerazione *Bacillus cereus* Rapporti ISTISAN 96/35



INTERPRETAZIONE PROVE BIOCHIMICHE <i>B. CEREUS</i> (GRUPPO)	
PEMBA	Colonie dentate, circa 5 mm color blu-turchese con alone di precipitazione (mannitolo - lecitinasi +)
MYP	Colonie di circa 5 mm color rosa con alone di precipitazione (mannitolo - lecitinasi +)
ESAME MICROSCOPICO	Cellule vegetative 4-5 μ m di lunghezza, larghe 1-5 μ m. Spore vede più o meno pallido centrali o paracentrali senza sporangio. Globuli lipidici neri. Citoplasma rosso
FERMENTAZIONE GLUCOSIO	Produzione di color giallo e usualmente di gas
REAZIONE VOGES-PROSKAUER	Produzione di acetilmetilcarbinolo (95% dei casi) evidenziata da color rosa dopo addizione dei reattivi
RIDUZIONE DEI NITRATI	Nitrati a nitriti evidenziata da color rosso dopo addizione dei reattivi

PROVE PER DIFFERENZIARE IL <i>B. CEREUS</i> DA ALTRI BACILLI (<i>B. mycoides</i> , <i>B. thuringensis</i> , <i>B. antracis</i>)	
a) Emolisi su agar sangue di montone (T 14)	c) Aspetto delle colonie in agar sangue
b) Mobilità (T 106)	d) Presenza di cristalli parasporali

ESPRESSIONE DEL RISULTATO

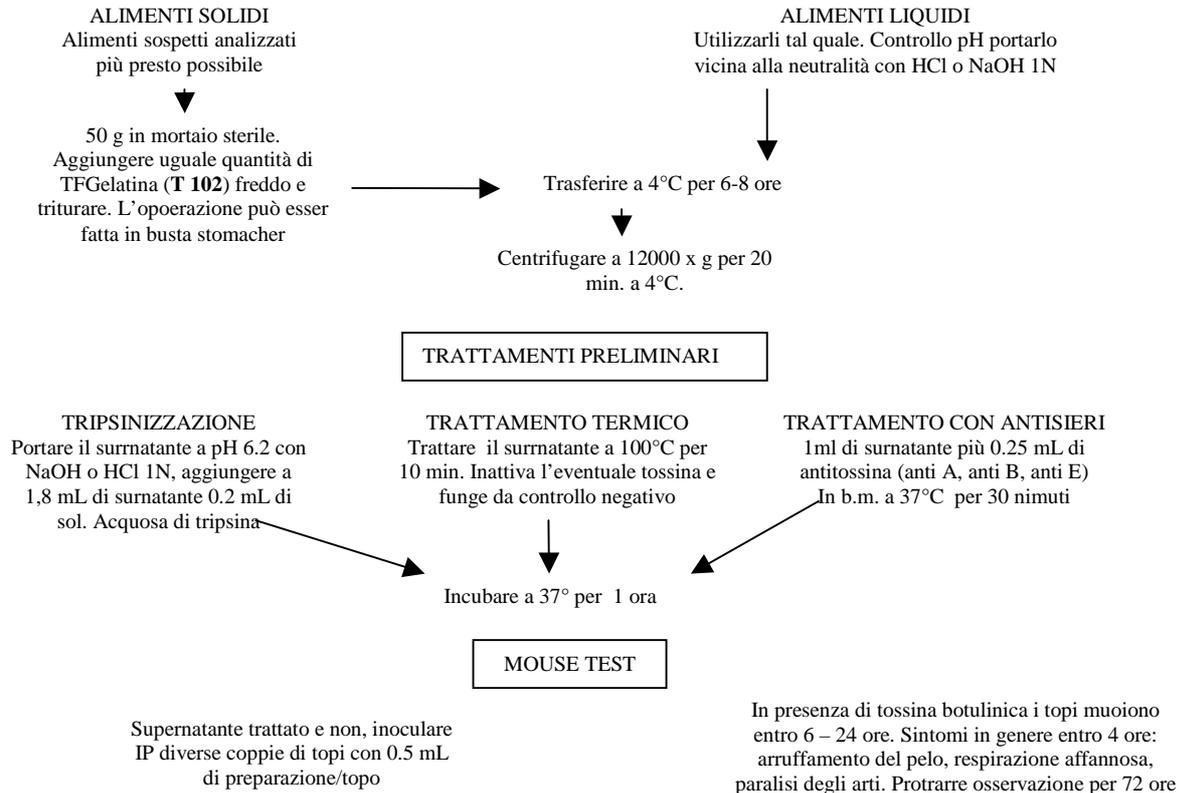
$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t}$$

Dove:

C = n. di colonie confermate per 100 mL
A = n. di colonie confermate
B = n. di colonie da sottoporre a conferma
N = n. di colonie caratteristiche contate
V_T = volume (mL) di campione analizzato
V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
F = fattore di diluizione

1.2.21 Ricerca di *Clostridium botulinum* e sue tossine (Tipo A-B E) Rapporti ISTISAN 96/35

CARATTERISTICHE	Il <i>C. botulinum</i> corrisponde più a un consorzio di specie che a una specie tassonomicamente definita. Produce neurotossine dall'azione paralizzante immunolog. Differenti ma dallo stesso effetto (<i>C. barati</i> e <i>C. butyricum</i> producono tossine botuliniche). Tutti i tipi sviluppano a 37°C, pH prossimo alla neutralità non cresce a pH <4.5 (4.6-8.3). La tossina è tremolabile (80-100°C per 30 min) distrutta a 100°C. Sviluppo e produzione di tossina può avvenire a temp. E concentrazione di Aw e di NaCl a secondo del tipo.
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Incubazione 18-36 ore. Il botulismo è malattia grave per l'uomo e gli animali. Paralisi muscolare con inizio da occhi e faccia, poi torace, braccia e gambe; può avvenire morte per asfissia
HABITAT	Carni, conserve (soprattutto prod. familiare), verdure, prosciutti affumicati o salati (preparazione artigianale) Il B. di tipo E è legato al consumo di pesce. (botulismo da pesce).



Coppia topi	Surnatante	Trattamento
n. 1	1 mL	Nessuno
n. 2	1.8 mL	0.2 mL sol. tripsina
n. 3	1 mL	0.25 mL anti A-B-E
n. 4	1.5 mL	100°C per 10 min b.m.

Risultato se presente botulinica tossina	
Coppia n. 1	2 morti
Coppia n. 2	2 morti
Coppia n. 3	2 vivi
Coppia n. 4	2 vivi

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

**IDENTIFICAZIONE DELLE TOSSINE
CALCOLO DELLA MINIMA DOSE LETALE mL (MDL/mL)**

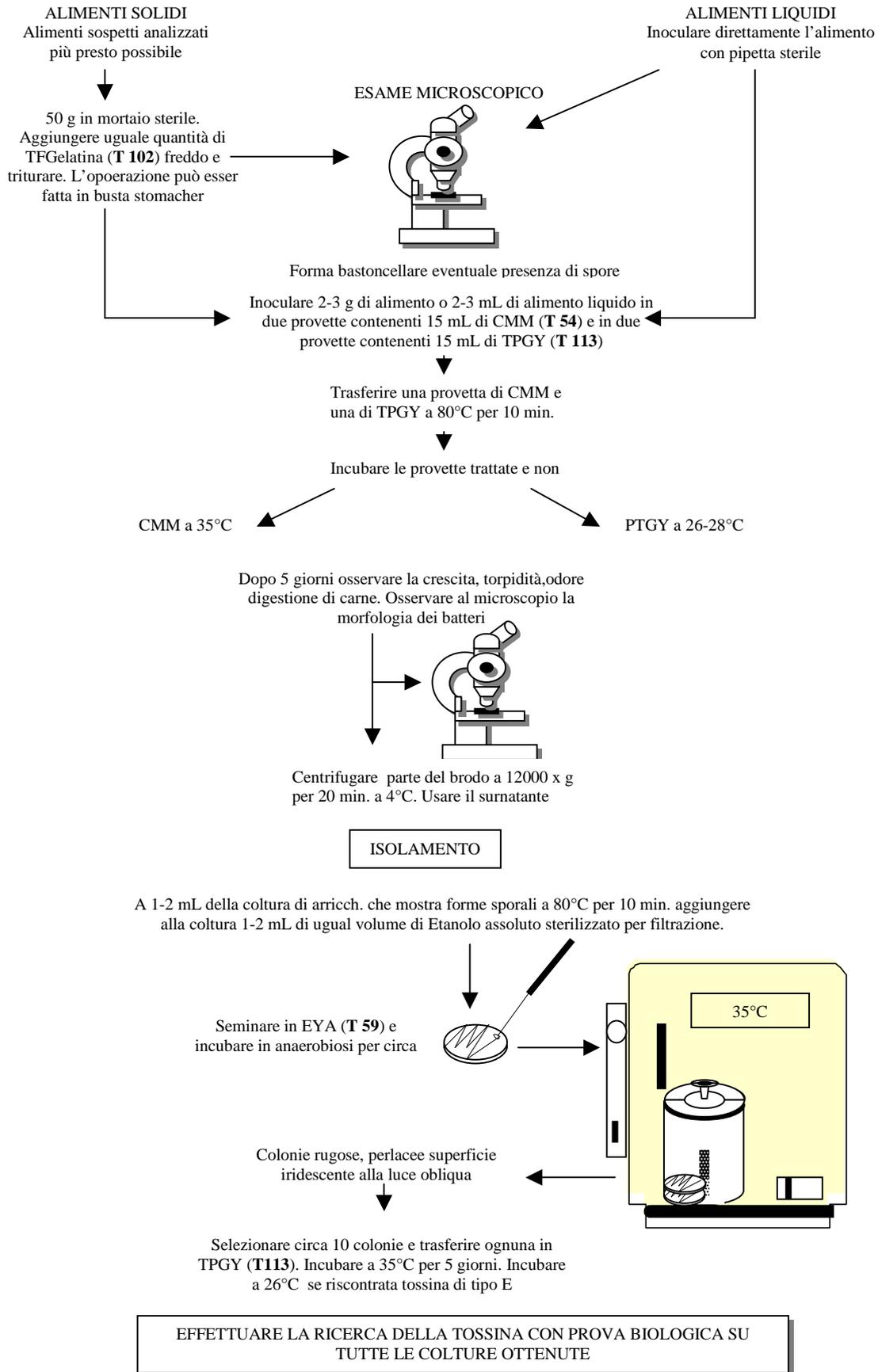
Diluire il surnatante con TFG (**T 102**) 1:2 – 1:10 -1:100 -1:1000 e inoculare ogni coppia di topi con 0.5 mL di ogni diluizione. Osservare i topi per 72 ore.

Determinare la MDL utilizzando la diluizione precedente a quella che uccide tutti i topi. Trattare questa con sieri monospecifici anti A, anti B, anti E (titolo 10 UI/mL) aggiungendo separatamente 0.25 mL dei sieri secondo lo schema sotto riportato e mantenendo a 37°C per 30 min. in b.m.

Coppia topi	Diluiz. Estratto	Trattamento
n. 1	1 mL	Nessuno
n.2	1 mL	0.25 mL anti A
n.3	1 mL	0.25 mL anti B
n.4	1 mL	0.25 mL anti E

Controllare periodicamente i topi per tre giorni

1.2.22 Ricerca delle spore di *Clostridium botulinum* e identificazione Rapporti ISTISAN 96/35



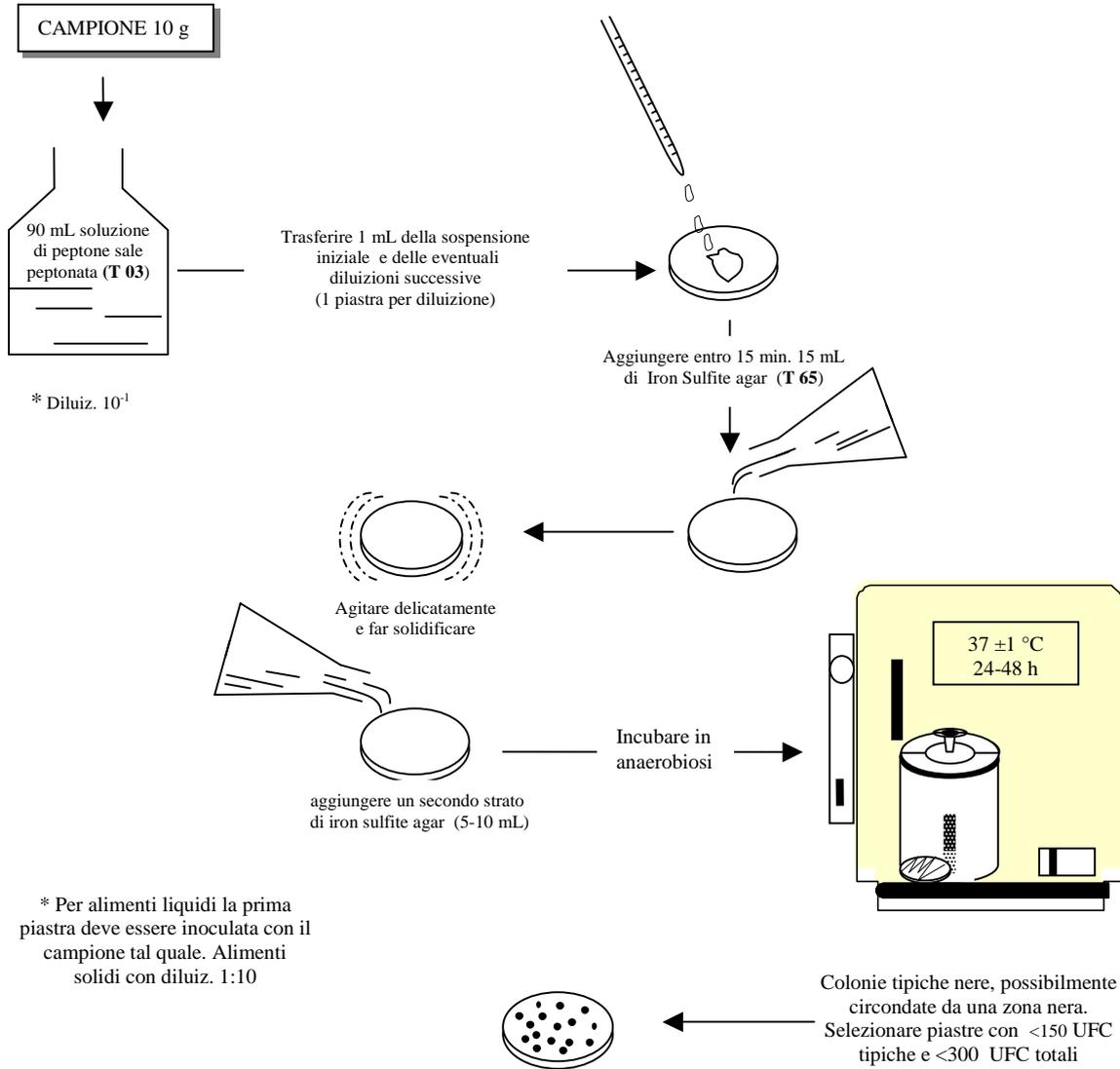
1.2.23 Conta di batteri solfito riduttori negli alimenti (ISO 15213:2003)

CARATTERISTICHE

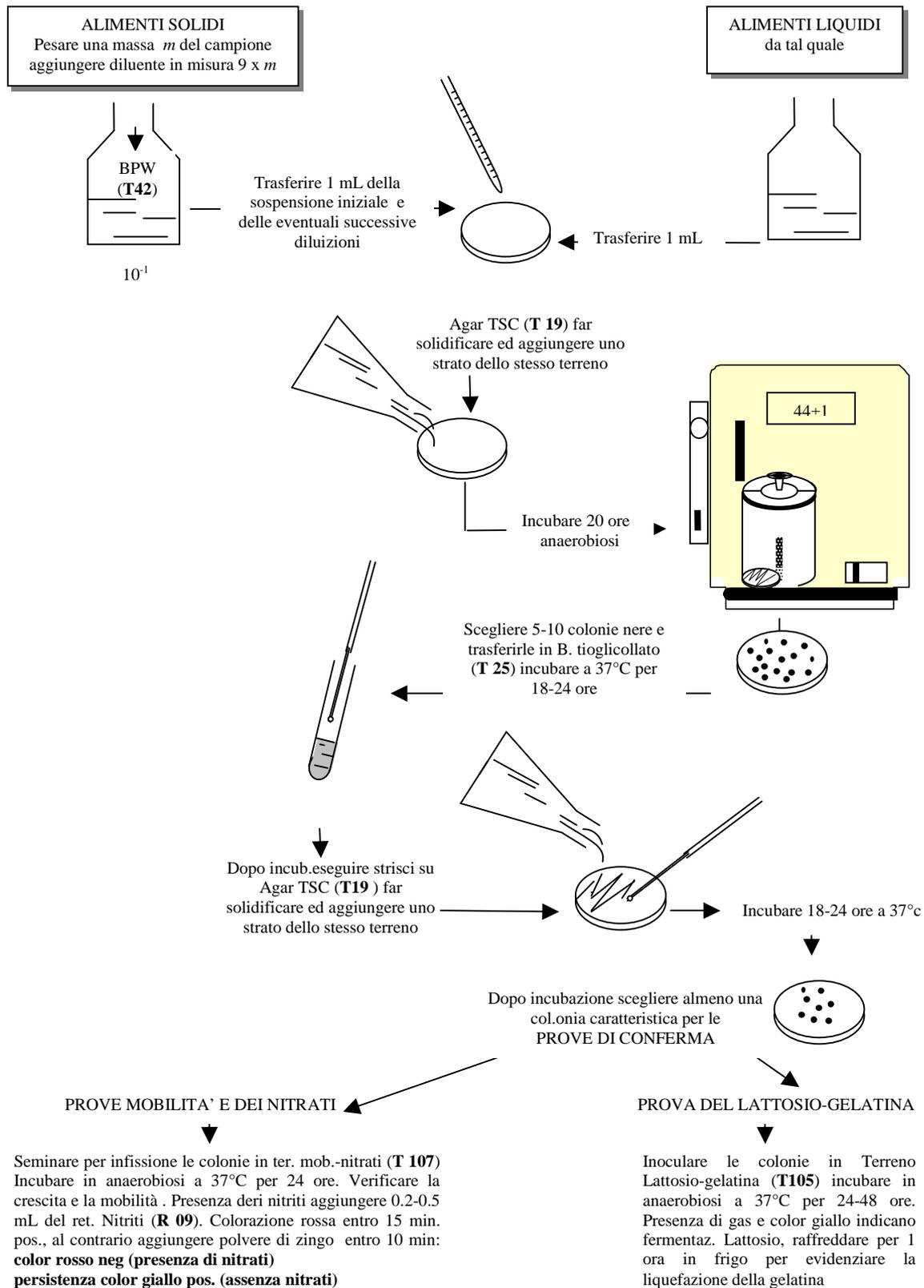
Il gruppo dei clostridi solfito riduttori comprende quei clostridi dotati della capacità di ridurre i composti ossidati dello zolfo a solfuro. Si tratta di bacilli sporigeni Gram-positivi, anaerobi stretti. A questo gruppo appartengono sia un patogeno quale il *Clostridium perfringens*, sia microorganismi apatogeni quali *C. baratti*, *C. bifermentans*, *C. celatum*, *C. novyi*, *C. putrificum*, *C. paraputrificum*, *C. pasteurianum*, *C. roseum*, *C. ramosum*, *C. saccarolyticum*, *C. tertium*

DIFFUSIONE

Normalmente saprofiti si ritrovano nel terreno e nell'intestino di alcuni animali, incluso l'uomo



1.2.24 Numerazione *Clostridium perfringens* Rapporti ISTISAN 96/35



Espressione del risultato

$$a = \frac{b}{A} * C$$

C Numero di colonie sospette
b Numero di colonie
A Numero di colonie saggiate
a Numero di colonie calcolate

Dopo le prove di conferme utilizzare la seguente formula per calcolare il numero di colonie appartenenti alla specie

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

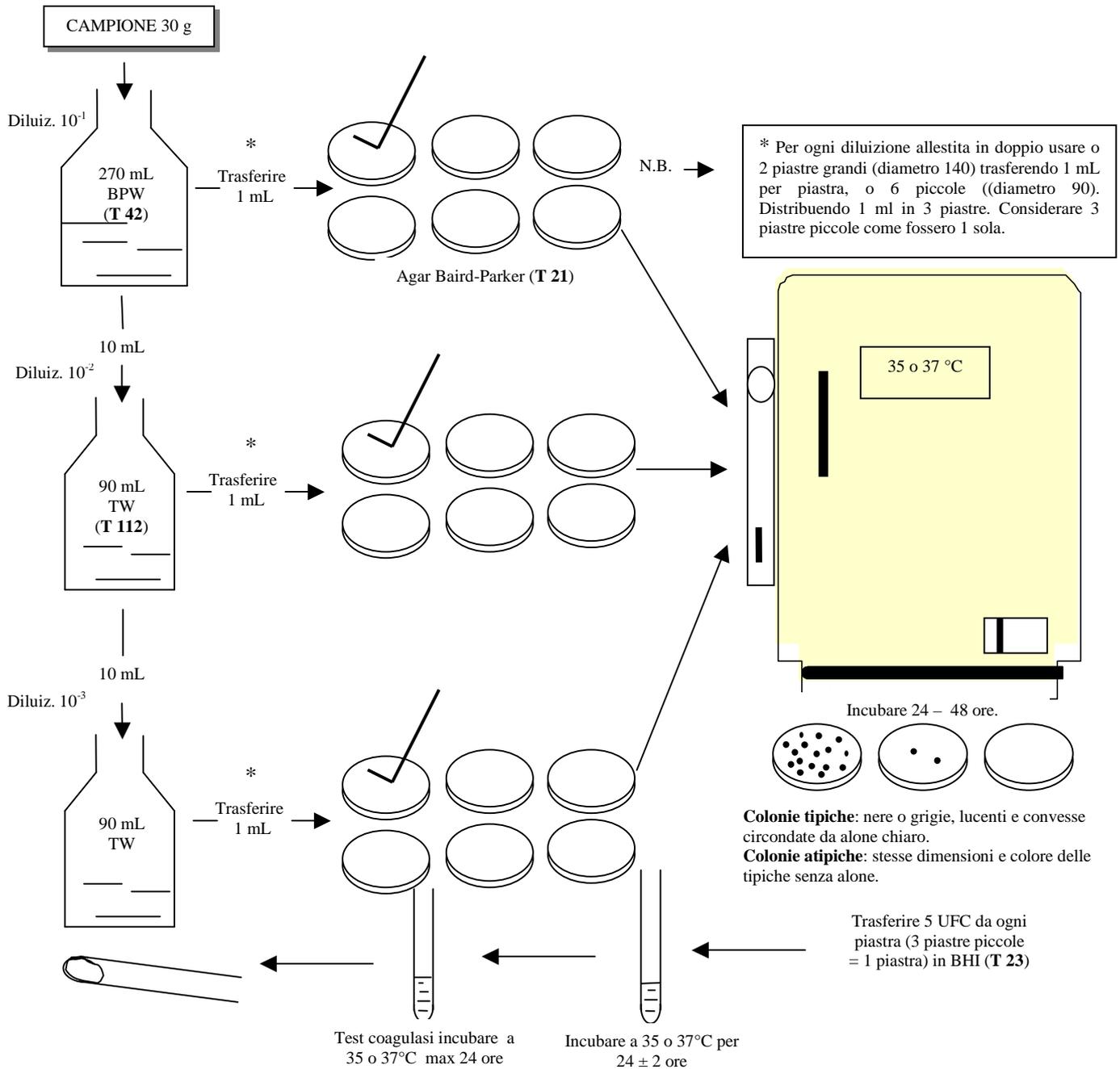
$\sum C$ somma delle colonie confermate
V volume dell'inoculo in mL in ogni piastra
 n_1 numero delle piastre considerate per la prima diluizione
 n_2 numero delle piastre considerate per la seconda diluizione
d fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione

1.2.25 Metodo orizzontale per la conta di Stafilococchi coagulasi-positivi (*Stafilococcus aureus* e altre specie) UNI EN ISO 6888 – 1:2004

CARATTERISTICHE Gram + catalasi + coagulasi + riduce i nitrati. Non sporigeno. Moderatamente alofilo produce alfa beta gamma delta emolisi. Sviluppa a 30-37°C (5,6-46°C) pH 7,0-7,5 aw 0,86-0,87. Produce due tipi di enterotossina. Glucosio, lattosio, mannosio positivi.

MANIFESTAZIONI CLINICHE Incubazione 2-4 ore (1-8) nausea, vomito, dolori addominali, prostrazione, raramente diarrea disidratazione, temperatura inferiore alla norma. Durata 1-2 giorni.

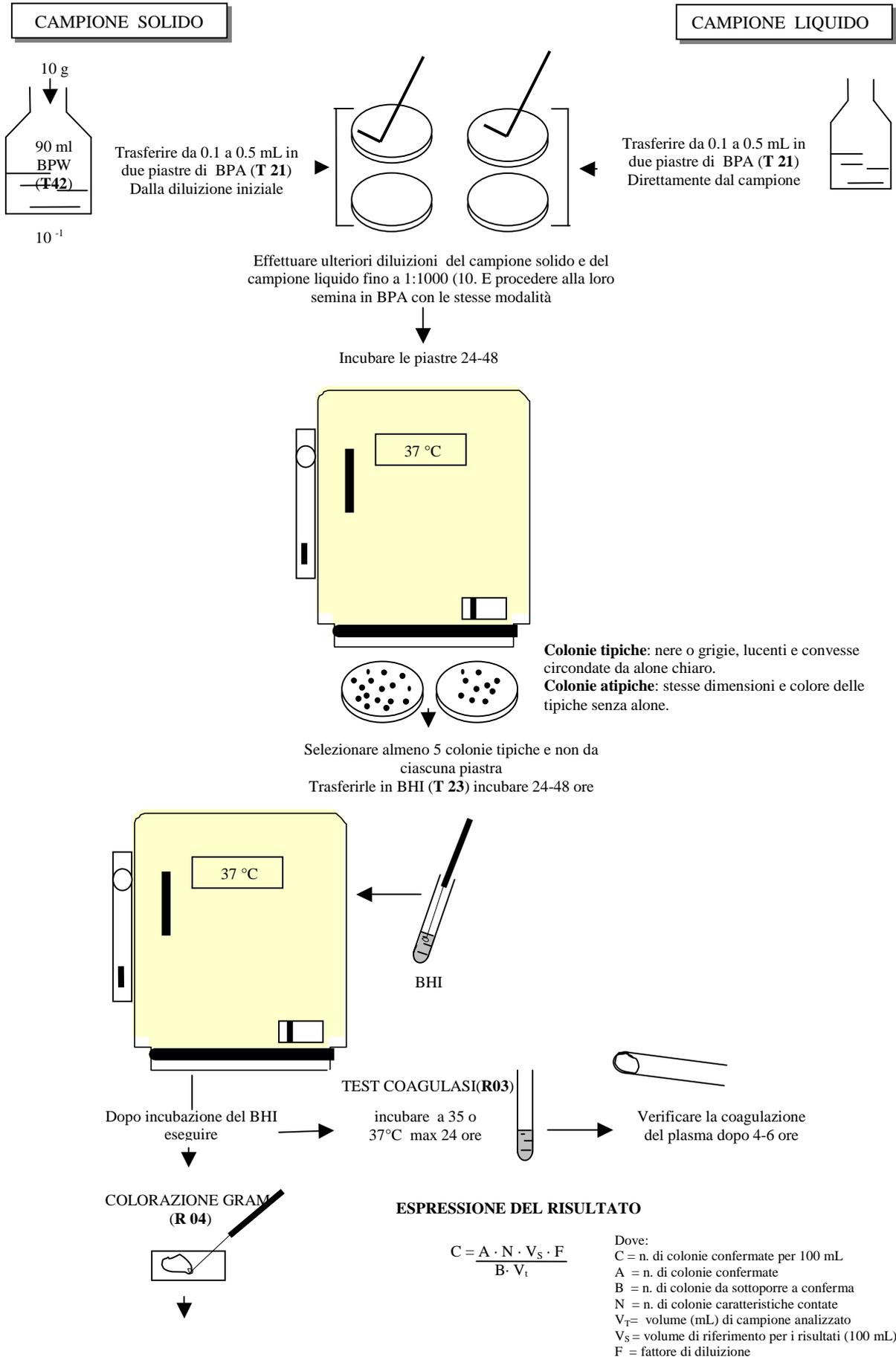
HABITAT Carni, pesce, salumi, pasticceria, gelato, insaccati.



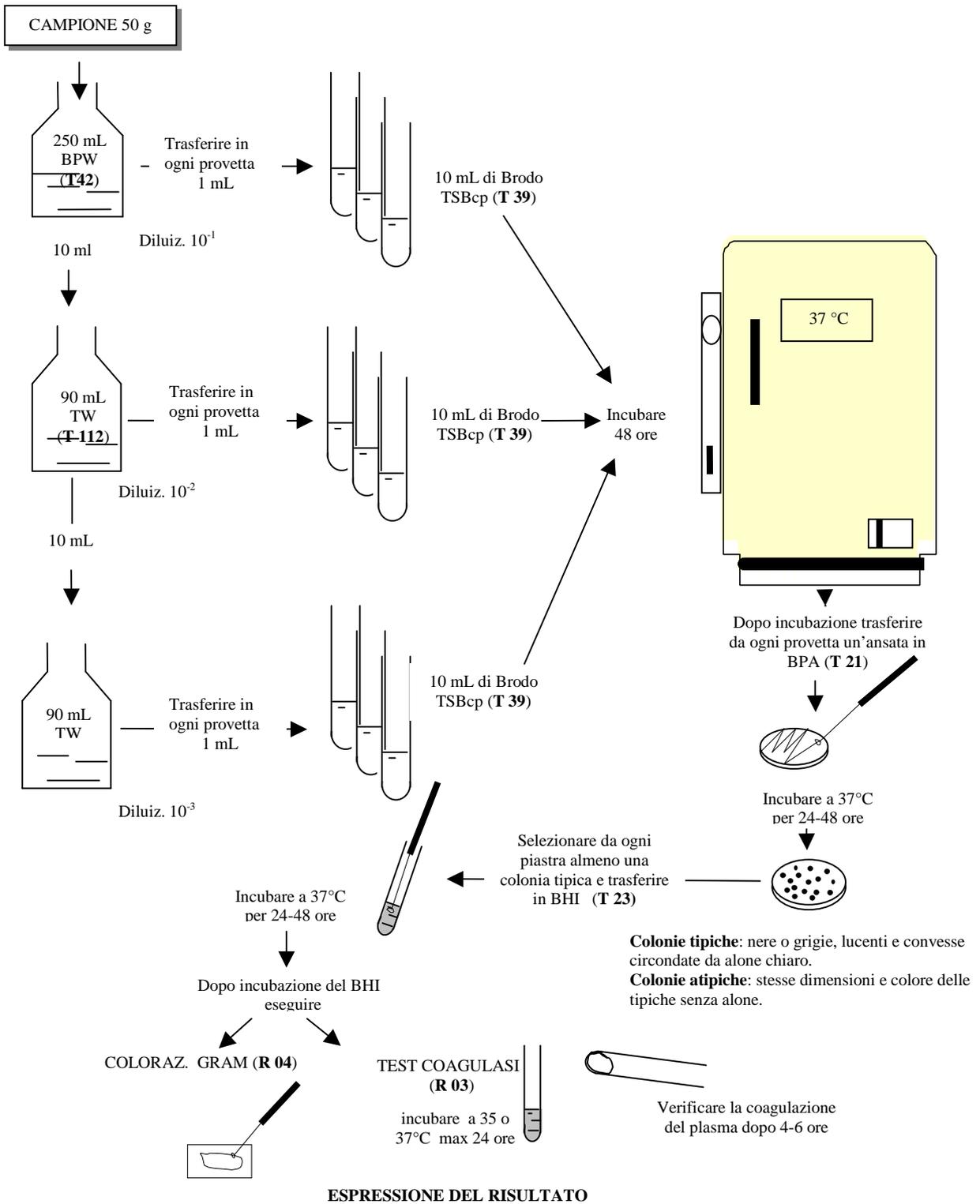
$$UFCg / ml = \frac{\Sigma a}{V(n_1 + 01n_2)d}$$

Σa somma delle colonie confermate
 V volume dell'inoculo in mL in ogni piastra
 n_1 numero delle piastre considerate per la prima diluizione
 n_2 numero delle piastre considerate per la seconda diluizione
 d fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione

1.2.26 *Staphylococcus aureus* Rapporti ISTISAN 96/35



1.2.27 *Staphylococcus aureus* Rapporti ISTISAN 96/35 (Tecnica MPN)



Leggere il valore MPN/g o mL nella tabella n.1 di Mac Crady e moltiplicare tale valore per l'inverso del fattore di diluizione della prima serie di provette considerata per ricostruire il numero caratteristico. Il valore MPN rilevato dalla tabella determina il Numero Più Probabile tramite la formula

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

C_s = concentrazione più probabile nella quantità di riferimento V_s
 N = valore MPN letto nella tabella n.1
 F = fattore di diluiz. Della diluiz. Base Prescelta (es. $F=10, 100$ etc.)
 V = fattore di diluizione in base alla tabella
 V_s = quantità di riferimento scelta (g o mL)

1.2.28 Conta *Pseudomonas* spp in carne e prodotti a base di carne (ISO 13720:2010)

CARATTERISTICHE

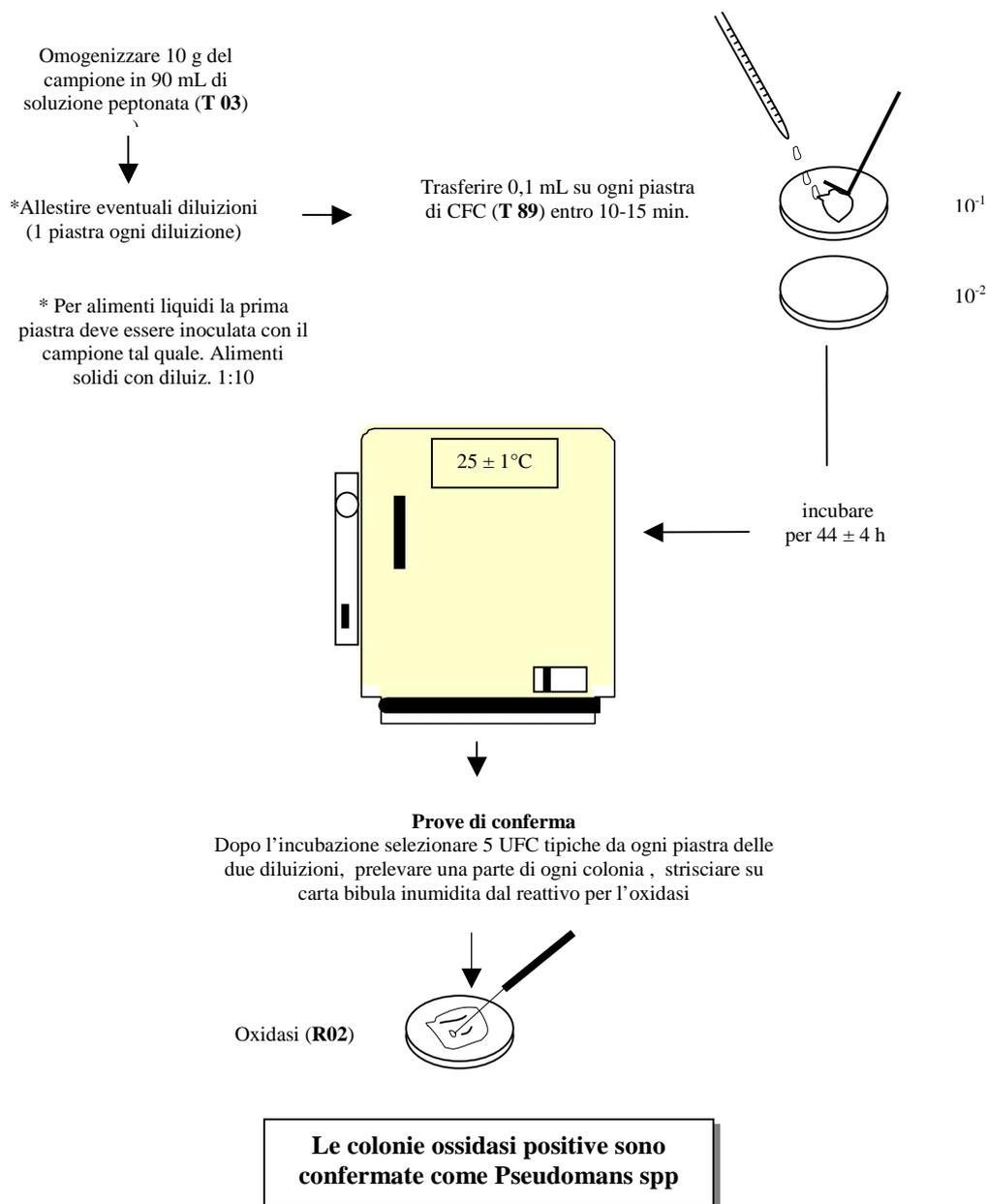
Pseudomonas spp sono batteri a forma di bastoncello, mobili per flagelli polari, Gram – aerobi, catalasi + e ossidasi +. I membri delle varie specie hanno caratteristiche metaboliche diverse, quindi sono in grado di colonizzare varie nicchie, molte specie producono pigmenti fluorescenti e/o colorati.

MANIFESTAZIONI CLINICHE

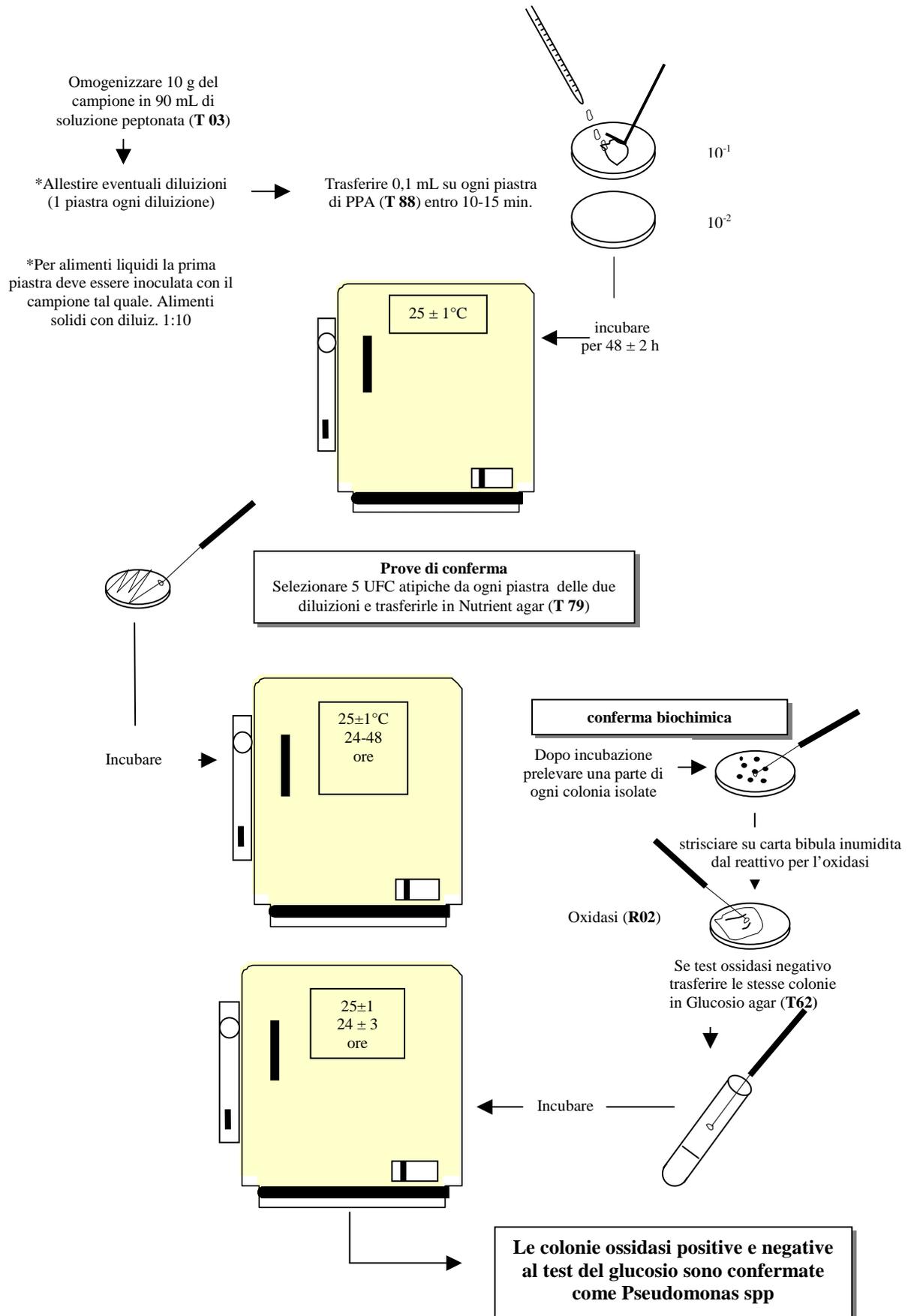
La maggior parte *Pseudomonas* spp. sono naturalmente resistenti alla penicillina e la maggior parte dei relativi beta-lattamici antibiotici. Provocano infezioni alle vie urinarie, ulcere corneali e cheratite, setticemie, gastroenteriti nei neonati, broncopolmoniti e meningiti.

HABITAT

Acque contaminate, vegetali, carni, latte e derivati. I batteri del genere *Pseudomonas* sono in grado di provocare negli alimenti numerosi fenomeni alterativi. Nel caso del latte ed i suoi prodotti derivati gli enzimi prodotti da questi microrganismi possono causare comparsa di sapore amaro, di odori atipici e di rancido, colore grigiastro, gelificazione dei prodotti UHT, difetti di struttura. Alcuni ceppi possono produrre pigmenti fluorescenti e/o colorati, che possono conferire all'alimento colorazioni innaturali.



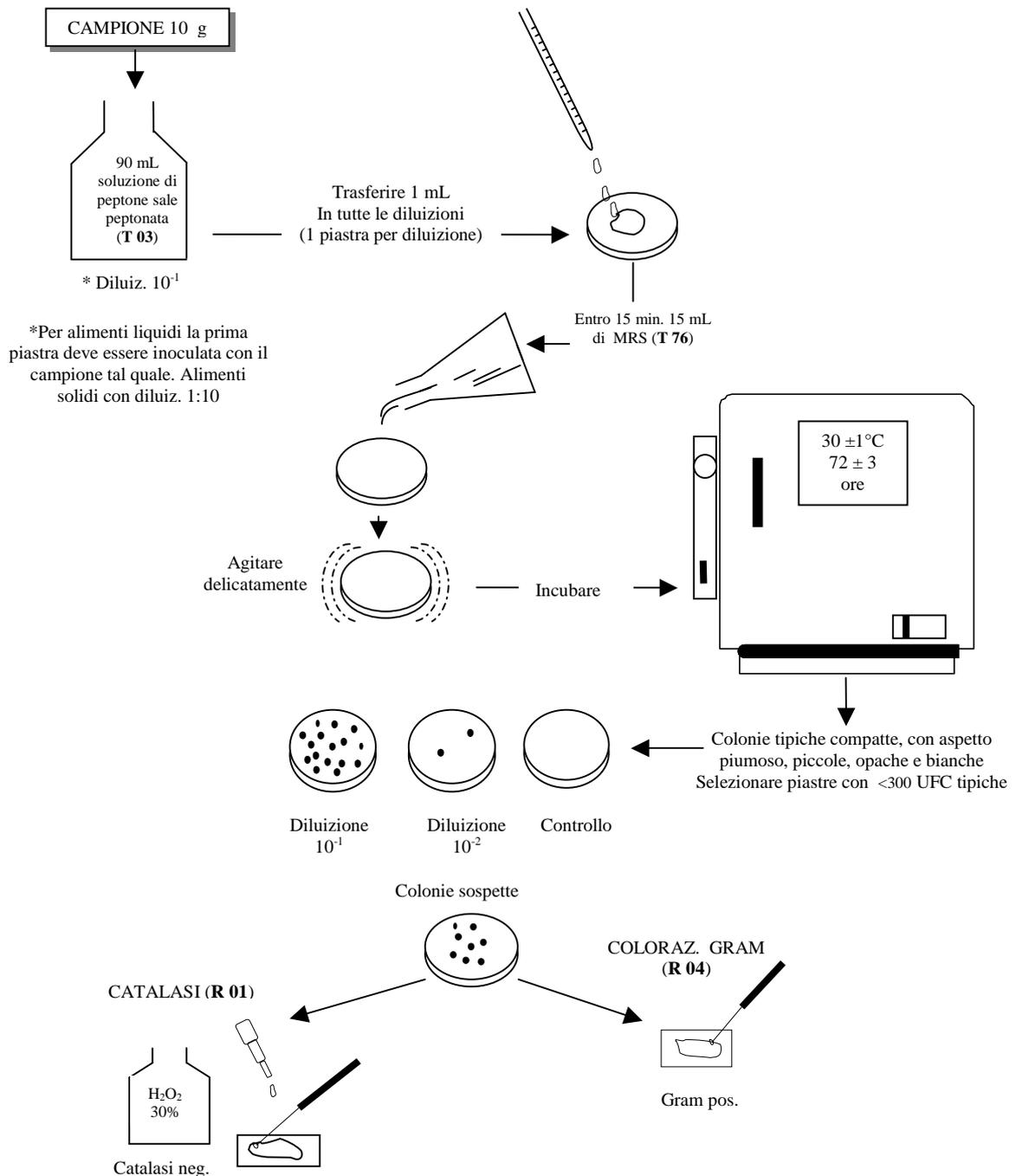
1.1.29 Conta *Pseudomonas* spp in latte e derivati (ISO/TS 11059:2009)



1.2.30 Conta di batteri lattici mesofili negli alimenti (ISO 15214:1998)

CARATTERISTICHE I batteri lattici sono bacilli Gram positivi, immobili, asporigeni, anaerobi microaerofili. Sono privi di catalasi, di citocromo ossidasi, di riduttasi attiva sui nitrati. Metabolizzano gli zuccheri con produzione di acido lattico. I mesofili si sviluppano a temperature al di sotto dei 40°C (con un optimum tra i 20 e i 30°C)

HABITAT Sono largamente diffusi in natura, benché, data la loro specializzazione, ogni specie sia confinata in uno o più habitat caratteristici, all'interno del quale i batteri lattici giocano spesso un ruolo importante, utile e desiderabile, anche quando non sono presenti in numero dominante. Infatti, questi habitat (vegetali, latte, intestino, ecc.) favoriscono la crescita di molti altri batteri chemio eterotrofi, ma la grande quantità di acidi organici (lattico e acetico) che si accumula con la crescita di batteri lattici, unita alla loro acido-tolleranza, alla produzione di acqua ossigenata e all'eventuale produzione di batteriocine o di sostanze antibiotico-simili, finisce col farli predominare numericamente. Si giustifica così l'effetto batteriostatico o battericida da essi esplicato nei confronti dei germi nocivi, responsabili delle alterazioni delle caratteristiche organolettiche degli alimenti fermentati (es. *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*) o pericolosi per la salute pubblica (es. *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*).



1.2.31 Ricerca lieviti e muffe - Rapporti ISTISAN 96/35

CARATTERISTICHE

I miceti hanno dimensioni maggiore dei batteri, possono essere unicellulari (lieviti) o filamentosi pluricellulari (muffe) in questi ultimi la parte vegetativa è costituita da filamenti (ife) che producono spore (parte riproduttiva) l'insieme dell'ife costituisce il micelio. Le colonie con micelio aereo sono dette muffe. Quelle costituite da blastospore isolate di consistenza cremosa sono colonie-lievito. Le colonie di blastospore con capacità di produrre pseudomicelio sono dette lievito formi. Il corpo di un micete unicell. o filamentoso è detto tallo e si origina sempre da una spora. La spora si riproduce per via sessuale, asessuale o vegetativa.

MANIFESTAZIONI CLINICHE

I miceti sono responsabili di micosi superficiali (tinea o pitiriasi versicolor), cutanee (tigne o tricofizie), sottocutanee (sporotricosi) e sistemiche (blastomicosi). Tra i lieviti la Candida albicans è causa di infezioni acute o subacute. Nell'acqua i funghi assumono significato negativo (produzione di micotossine), negli alimenti il limite di accettabilità è variabile ed in funzione della materia prima, la sua conservazione ed i processi di produzione. Comunque cariche elevate di miceti possono deteriorare

HABITAT

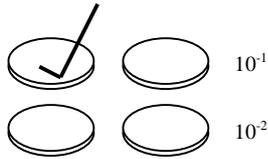
Presenti in terreni e materie prime crescono anche in condizioni estreme, quali basse temperature, elevata acidità, scarsità di acqua. I lieviti si ritrovano anche in ambienti acquatici e la spora fungina può vivere anni in condizioni sfavorevoli

Omogenizzare in 270 mL di BPW (T 42) 30 g del campione

*Allestire eventuali diluizioni (Due piastre ogni diluizione) Trasferire 0,1 mL su ogni piastra** entro 10-15 min.

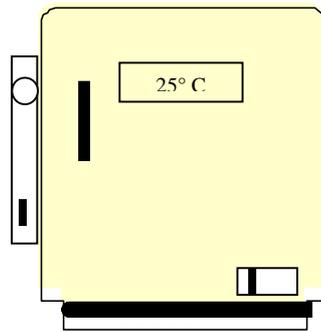
*Per alimenti liquidi le prime due piastre devono essere inoculate con il campione tal quale. Alimenti solidi con diluiz. 1:10

N.B. La tecnica migliore è ritenuta quella per spatolamento. Se si adotta il metodo per inclusione trasferire 1 mL per piastra e ricoprire con 15-20 mL di terreno di coltura.



**Usare per carne e derivati : Yeast-dextrose oxytetraciline-gentamicin-agar (T 125) Per gli altri alimenti: Yeast-dexstrose-clhoramphenicolo-agar-medium (T 124)

incubare per 3-5 gg



Annotare le colonie presuntive considerando le piastre che contengono tra 15 e 150 colonie

MUFFE

larghe piatte superficie fioccosa o cotonosa o polverulenta bianche o colorate.

*LIEVITI

piccole mucose spesso con odore di lievito di pane

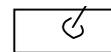
Eventualmente prelevare con l'ansa parte di una colonia ed allestire preparato microscopico.

Colorazione Gram (R 04.)



Lieviti forma ovale, grandi blu-neri Gram positivi

Esama a fresco stemperare le col. In 1 goccia di H₂O sterile. Coprire con vetrino copri oggetti.



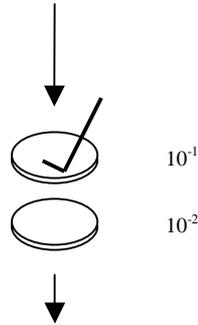
1.2.32 Conta lieviti e muffe in alimenti con $a_w > 0.95$ (ISO 21527-1:2008)

Omogenizzare 10 g del campione in 90 mL di soluzione peptonata 0.1% (T 03)



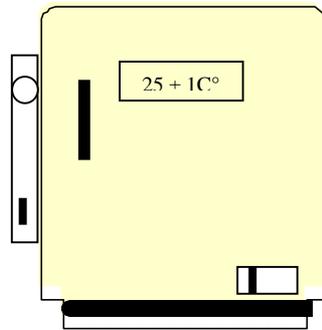
*Allestire eventuali diluizioni (Una piastra ogni diluizione)
Trasferire 0,1 mL su ogni piastra di DRBC (T 58)

*Per alimenti liquidi la prima piastra deve essere inoculata con il campione tal quale. Alimenti solidi con diluiz. 1:10



N.B. La tecnica migliore è ritenuta quella per spatolamento. Se si adotta il metodo per inclusione trasferire 1 mL per piastra e ricoprire con 15-20 mL di terreno di coltura.

incubare per 2-5 gg



Annotare le colonie presuntive considerando le piastre che contengono tra 10 e 150 colonie

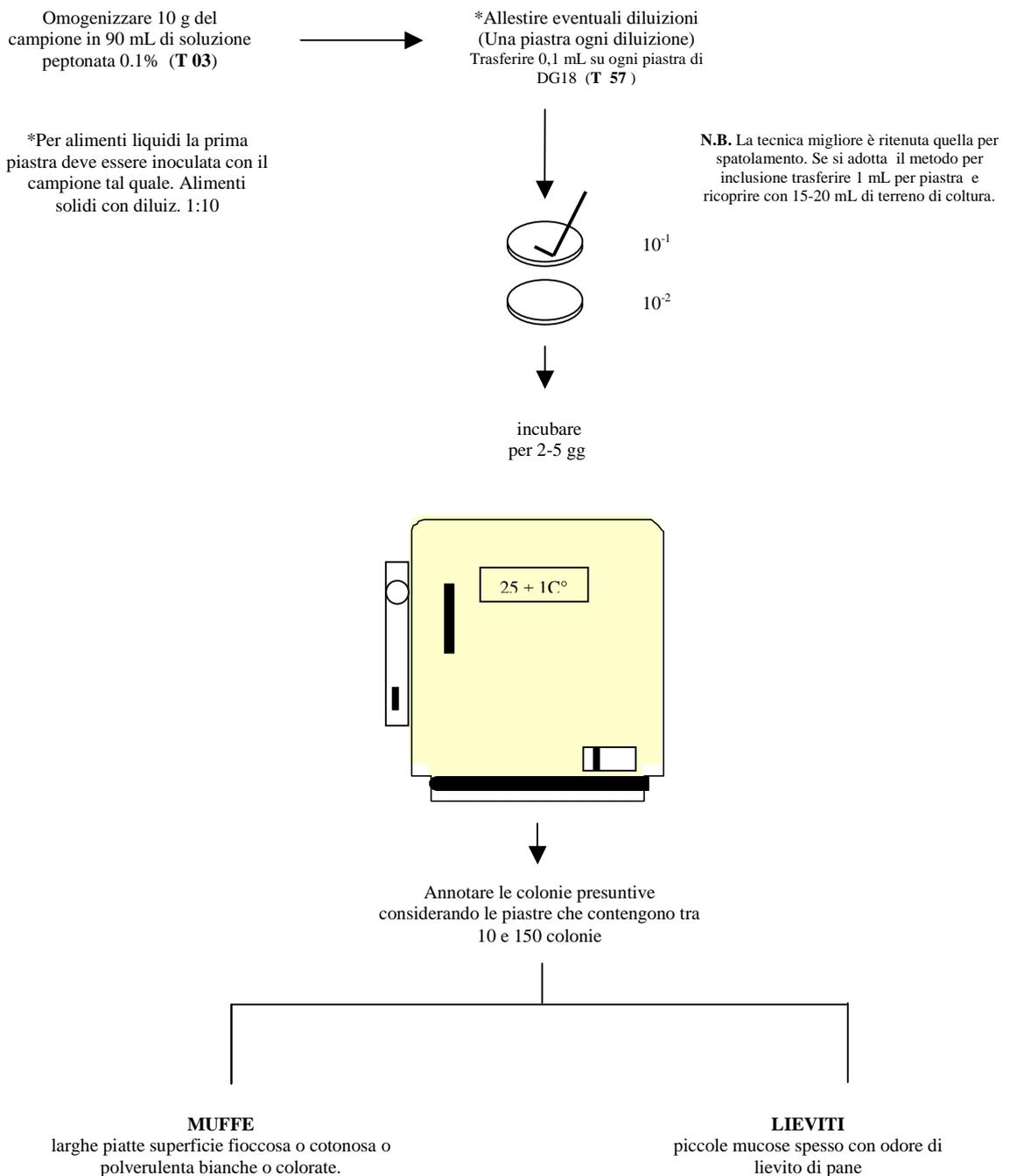
MUFFE

larghe piatte superficie fioccosa o cotonosa o polverulenta bianche o colorate.

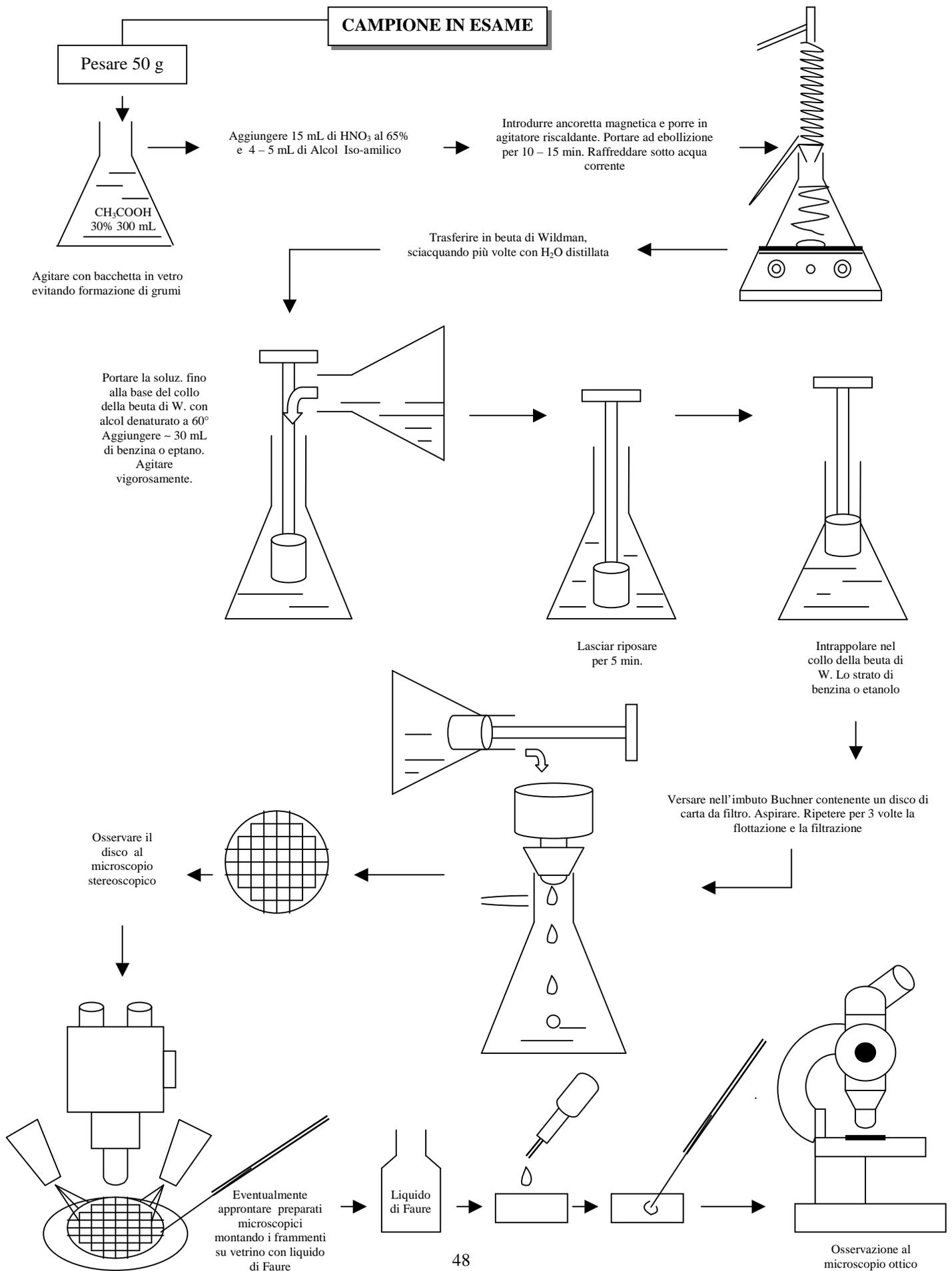
LIEVITI

piccole mucose spesso con odore di lievito di pane

1.2.33 Conta lieviti e muffe in alimenti con $a_w \leq 0.95$ (ISO 21527-2:2008)



**1.2.34 Filth-test sfarinati e prodotti di trasformazione
(DM 12.01.1999 GU n. 64 18.03.1999)**



1.2.35 Schema riassuntivo dei terreni colturali per ricerche microbiologiche su alimenti

Microrganismi	Metodo	Terreni arricchimento e arricchimento selettivo	Terreni selettivi	Terreni differenziali e reattivi
Prove di sterilità		Plate count broth(PCB) Plate count agar (PCA)		
Carica batterica mesofila	UNI EN ISO 4833:2004	Buffered peptone water (BPW) Acqua triptonata (TW) Plate count agar (PCA) Agar gelisato		
Coliformi	UNI EN ISO 4831	Buffered peptone water (BPW) Acqua triptonata (TW)	Verde brillante (BGB)	
Coliformi	ISO 4832:2006	Buffered peptone water (BPW) Acqua triptonata (TW)	Violet red bile lactose agar lactose agar (VRGL) Brilliant green lactose bile broth (BGLB)	
Enterobacteriaceae	ISO 21258-2:2004	Buffered peptone water (BPW) Acqua triptonata (TW) Nutrient agar Glucose agar	Violet red bile glucose agar (VRGG)	Ossidasi
Salmonella uova fresche	Rapporti ISTISAN 96/35	Acqua peptonata tamponata Tryptic soy agar (TSA) Plate count agar (PCA)	Hektoen enteric agar (HEA) Muller-Kauffmann tetrathionate broth (MK) Rappaport Vassiliadis s.p. br (RVS)	Colorazione di Gram Ossidasi Sieri gruppo
Salmonella nei molluschi	Rapporti ISTISAN 96/35	Acqua peptonata tamponata (APT)	Semi solid Rappaport-Vassiliadis med.(MSRV)	Siero agglut. anti-H
Salmonella spp	UNI EN ISO 6579:2004	Buffered peptone water (BPW) Plate count agar (PCA)	Muller-Kauffmann tetrathionate broth (MK) Semi solid Rappaport-Vassiliadis med.(MSRV) Hektoen enteric agar (HEA) Xiliosio lisina desossicolato agar (XLD) Rappaport-Vassiliadis soya peptone br. (RVS)	Triple sugar iron agar β-galattosidasi Urea agar Lisine iron agar Sieri gruppo
<i>Escherichia coli</i> (β-glucuronidasi positivo)	ISO 16649-2:2001	Buffered peptone water (BPW) Acqua triptonata (TW)	Tryptone bile glucuronide medium (TBX)	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Rapporti ISTISAN 96/35	Brodo peptone sorbitolo Sali biliari (PSB) Brodo irgasan ticarcillina clorato di potassio (ITC) Cefsulotina irgasan novobiocina agar (CIN) Agar nutritivo	Salmonella shigella desossicolato di sodio Sali di calcio (SSDC)	Urea triptofano ossidasi Deaminasi Agar Kligler Test biochimici
<i>Listeria monocytogenes</i> (negli alimenti escluso latte e derivati)	Rapporti ISTISAN 96/35	Half fraser broth Listeria Fraser broth (FB) Brodo triptone soya estratto di lievito (TSYEB) Agar triptone soya estratto di lievito (TSYEA)	Oxford agar Listeria palcam agar (LPA)	CAMP test Mobilità Catalasi Colorazione di Gram Test biochimici

Microorganismi	Metodo	Terreni arricchimento e arricchimento selettivo	Terreni selettivi	Terreni differenziali e reattivi
<i>Listeria monocytogenes</i> (nel latte e derivati)	Rapporti ISTISAN 96/35	Brodo arricchimento selettivo (EB) Brodo arricchimento selettivo tamponato (BEB) Agar triptone soya estratto di lievito (TSYEA) Brodo triptone soya estratto di lievito (TSYEB)	Listeria palcam agar (LPA) Oxford agar	CAMP test Terreno per la mobilità Colorazione di Gram Catalasi Test biochimici
<i>Listeria monocytogenes</i> (numerazione)	Rapporti ISTISAN 96-35	Acqua peptonata tamponata (APT) Listeria Fraser broth (FB) Agar triptone soya estratto di lievito (TSYEA) Brodo triptone soya estratto di lievito (TSYEB) Agar sangue Columbia (ASC)	Oxford agar	Brodo per utilizzazione dei carboidrati Terreno per la mobilità
<i>Listeria monocytogenes</i>	UNI EN ISO 11290-1:2005	Agar triptone soya estratto di lievito (TSYEA) Brodo triptone soya estratto di lievito (TSYEB)	Listeria accordino to Ottavini-Agosti (ALOA) Listeria palcam agar (LPA)	CAMP test Catalasi Colorazione di Gram Ter. per la mobilità Brodo utilizzazione dei carboidrati
<i>Listeria monocytogenes</i>	UNI EN ISO 11290-2:2005	Half-Fraser broth Agar triptone soya estratto di lievito (TSYEA) Brodo triptone soya estratto di lievito (TSYEB)	Listeria accordino to Ottavini-Agosti (ALOA) Listeria palcam agar (LPA)	CAMP test Catalasi Col.razione di Gram Ter. per la mobilità Brodo putillizzazione dei carboidrati
<i>Vibrio colerae</i>	Rapporti ISTISAN 96/35	Acqua peptonata alcalina (AP) Brodo gelatina fosfato (GPSB) Agar gelatina fosfato (GPSA)	Tiosolfato citrato bile saccarosio agar (TCBS)	Triple soy agar 1% NaCl (TSA) Agar ferro Kligler Prove biochimiche
<i>Vibrio paraemolyticus</i>	Rapporti ISTISAN 96/35	Brodo salt polimixina B (SPB) Brodo salino glucosio sodio duodecil lauril solfato (GSTB) Agar trifetil tetrazolio (TSAT) Agar nutritivo salino Acqua peptonata salina alcalica (APA)	Tiosolfato citrato bile saccarosio agar (TCBS)	Ossidasi Terreno per la mobilità Test biochimici
Campylobacter termoresistente	Rapporti ISTISAN 96/35	Preston broth Park sanders Broth Preston agar Agar sangue nutritivo con supplementi (NBG) Brucella broth	Blutzler agar Modificato Karmali agar Campylobacter blood free selective agar (CAT) Skirrow agar	Colorazione di Gram Crescita 25 °C Test biochimici
<i>Bacillus cereus</i> presunto	UNI EN ISO 7932: 2005	Buffered peptone water (BPW) Acqua triptonata (TW)	Mannitolo egg yolk polymyxin agar (MYP)	

Microorganismi	Metodo	Terreni arricchimento e arricchimento selettivo	Terreni selettivi	Terreni differenziali e reattivi
<i>Bacillus cereus</i> Numerazione	Rapporti ISTISAN 96/35	Mannitol Egg yolk polymyxin agar (MYP) Agar sangue di montone	Peptone mannitol bromthymol bleu agar (PEMBA)	Glucose agar Reag. Per reazione di Voges-Proskauer Reag. evidenz. nitriti Reattivi per evidenziare cristalli parasporali Terreno mobilità
<i>Clostridium botulinum</i> Spore e identificazione	Rapporti ISTISAN 96/35	Tampone fosfato gelatina (TFGelatina) Cooked meat medium broth (CMM) Trypcase peptone glucose yeast (TPGY)	Egg yolk agar	
<i>Clostridium botulinum</i> e sue tossine	Rapporti ISTISAN 96/35	Tampone fosfato gelatina (TFGelatina)		Antisieri
<i>Clostridium perfringens</i>	Rapporti ISTISAN 96/35	Agar triptosio solfito cicloserina	Brodo tioglicollato	Ter. mobilità-nitrati Ter. lattosio gelatina - reat.per nitriti
Conta batteri solfito riduttori negli alimenti	ISO 15213:2003	Acqua peptonata	Iron sulfite agar	
Stafilococco Coagulasi positivo	UNI ENISO 6888-1	Bufferet peptone water (BPW) Acqua triptonata (TW) Brain Hearth infusion broth (BHI)	Baird parker agar (BPA)	Reattivo per coagulasi
<i>Stafilococcus Aureus</i>	Rapporti ISTISAN 96/35	Bufferet peptone water (BPW) Brain Heart infusion broth (BHI)	Baird parker agar (BP)	Coagulasi Colorazione di Gram
<i>Stafilococcus Aureus</i>	Rapporti ISTISAN 96/35 Metodo MPN	Bufferet peptone water (BPW) Brain Heart infusion broth (BHI)	Baird parker agar (BP)	Coagulasi Colorazione di Gram
<i>Pseudomonas</i> spp Carne e prodotti a base di carne	ISO 13720:2010	Soluzione peptonata	<i>Pseudomonas</i> agar base/CFC	Ossidasi
<i>Pseudomonas</i> spp In latte e derivati	ISO/TS 11059:2009	Soluzione peptonata Nutrient agar	<i>Pseudomonas</i> agar base con suppl.to PP	Ossidasi Glucosio agar
Batteri Lattici mesofili	ISO 15214:0998	Soluzione peptonata	MRS agar with tween 80	Coagulasi Colorazione di Gram
Lieviti e muffe	Rapporti ISTISAN 96/35	Bufferet peptone water (BPW) Nutrient agar	Yeast dextrose oxytetraciline gentomicin agar Yeast dextrose clhoranfenicolo agar medium	
Lieviti e muffe alimenti con aw > 0.95	ISO 21527-1:2008	Soluzione peptonata	DRBC agar base	
Lieviti e muffe alimenti con aw ≤ 0.95	ISO 21527-2:2008	Soluzione peptonata	DG 18 agar base	

2

Acque



2.1 Normativa e modalità

2.1.1 Acque potabili

Gli esami microbiologici per le acque potabili sono stabiliti, in attuazione della direttiva 98/83/CE, dal Decreto Legislativo del 2 febbraio 2001, n.31, che precisa (art.2) cosa si deve intendere per “acque destinate al consumo umano”:

- acque trattate e non trattate destinate ad uso potabile e preparazione cibi e bevande o altri usi domestici, fornite attraverso rete di distribuzione, cisterne, bottiglie o contenitori ;
- acque usate da imprese alimentari per fabbricazione , trattamento o conservazione o l'immissione nel mercato di prodotti o sostanze destinate al consumo umano;
- impianti di distribuzione domestici per l'erogazione dell'acqua destinata al consumo umano, compresa la rete esterna.

Il campionamento per le analisi deve essere fatto in recipienti sterili dalla capacità di almeno 500 mL e nel rispetto scrupoloso delle norme di asepsi.

Per le acque clorate è opportuno che le bottiglie usate per i prelievi contengano sodio tiosolfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 10% nella quantità di 1 mL per litro di acqua. Il campione va conservato in frigo a + 4°C fino al momento delle analisi.

Il D.Lgs. 31 per le analisi microbiologiche prevede nell'allegato I i seguenti parametri e valori:

PARAMETRI E VALORE DI PARAMETRO	
Parametro	Valori di parametro
<i>Escherichia coli</i>	0/100 mL
Enterococchi	0/100 mL

ACQUE IN VENDITA IN BOTTIGLIE O CONTENITORI	
Parametro	Valori di parametro
<i>Escherichia coli</i>	0/250 mL
Enterococchi	0/250 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 mL
Conteggio delle colonie a 22°C	100/ mL
Conteggio delle colonie a 37°C	20/ mL

PARAMETRI E VALORE DI PARAMETRO	
Parametro	Valori di parametro
* <i>Clostridium perfringens</i> (compreso spore)	0/100 mL
Conteggio delle colonie a 22°C	Senza variazioni ano male
Batteri coliformi a 37°C	0/100 mL
Per le acque confezionate in bottiglie o contenitori	250/ mL

*Tale parametro non deve essere misurato a meno che le acque provengano o siano influenzate da acque superficiali. In caso di non conformità con il valore parametrico la A.S.L. competente al controllo dell'approvvigionamento d'acqua deve accertarsi che non sussistano potenziali pericoli per la salute umana derivanti dalla presenza di microrganismi patogeni esempio il cryptosporidium. I risultati di tutti questi controlli debbono essere inseriti nelle relazioni che debbono essere predisposte ai sensi dell'art. 18 comma 1.

Il Decreto Legislativo sopra citato prevede inoltre due tipi di controllo:

Controllo di routine (Allegato II tabella A punto 1): intende ad intervalli regolari controllare la qualità organolettica e microbiologica delle acque fornite per il consumo umano, nonché l'efficacia di eventuali trattamenti di disinfezione a cui l'acqua può essere sottoposta, controlla i valori dei seguenti parametri:

- *Clostridium perfringens* comprese le spore (solo se le acque provengono o sono influenzate da acque superficiali);
- *Escherichia coli*;
- *Pseudomonas aeruginosa* (solo per le acque vendute in bottiglie o in contenitori);
- **Carica batterica a 22°C e 37°C** (solo se le acque provengono o sono influenzate da acque superficiali);
- **Batteri coliformi a 37°C**

Controllo di verifica (Allegato II tabella A punto 2): accerta che tutti i valori dei parametri contenuti nel decreto siano rispettati. L'autorità sanitaria competente, se lo ritiene opportuno, può inoltre ricercare i seguenti parametri accessori:

- **Alghe**
- **Elminti**
- **Enterovirus**
- **Protozoi**
- **Stafilococchi patogeni**
- **Batteriofagi anti E. coli**
- **Enterobatteri patogeni**
- **Funghi**
- *Pseudomonas aeruginosa*

La normativa non viene applicata per le acque minerali naturali e medicinali riconosciute, e tutte quelle acque, individuate da apposito decreto, destinate a quegli usi che non hanno ripercussioni dirette o indirette sulla salute dei consumatori.

2.1.2 Acque minerali

Per quanto riguarda le acque minerali la normativa di riferimento riportante i metodi di analisi da utilizzare è il DM del 13.1.1993 GU n. 14 del 19.01.1993 (Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali e modalità per i relativi prelievi dei campioni).

Il prelievo alla sorgente è effettuato dal personale tecnico laureato del laboratorio che esegue le prove (art.3 DM 13.1.93) alla presenza dell'autorità sanitaria competente per il territorio che redige il verbale di prelievo (art.4 DM 13.1.93). Ai fini del riconoscimento delle acque minerali naturali debbono essere eseguite le analisi microbiologiche secondo quanto previsto dall'art. 1 del DM 13.1.93.

E' opportuno effettuare il prelievo nel punto più vicino alla sorgente o pozzo. Sarebbe necessario, a tale proposito, che la condotta di adduzione fosse dotata di apposito rubinetto.

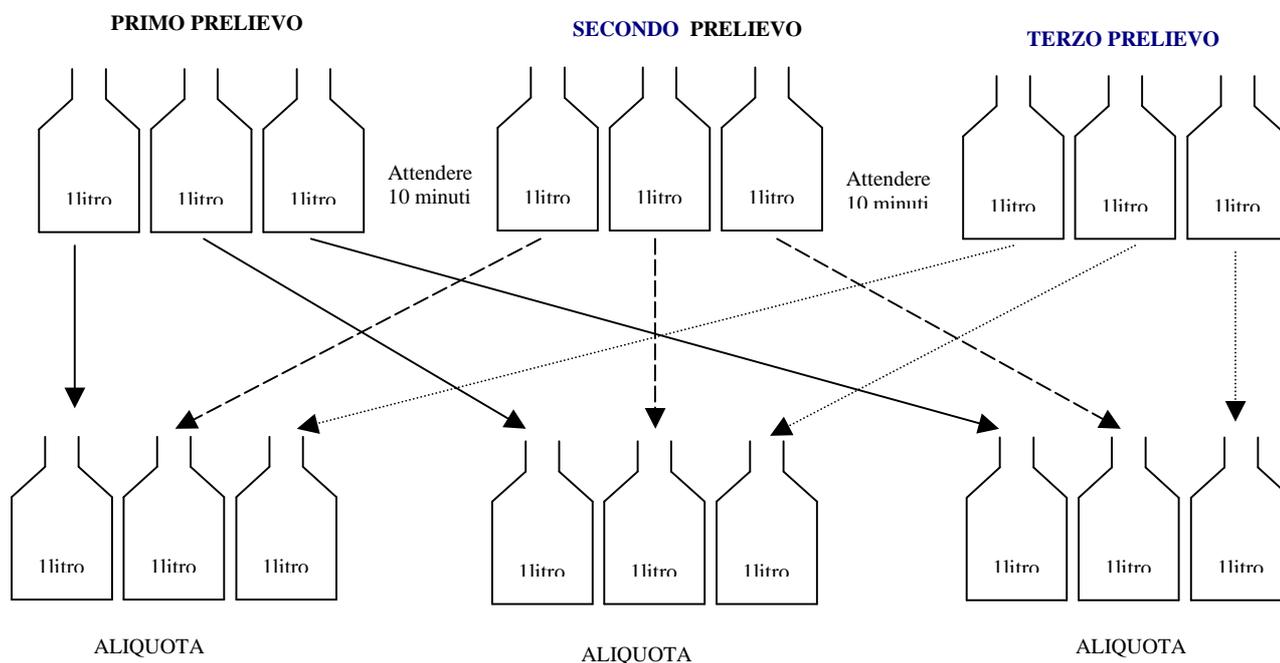
Prima del prelievo far scorrere l'acqua dal rubinetto alcuni minuti al fine di rinnovarla negli eventuali punti morti della condotta. Pulire con un batuffolo di ovatta imbevuto di alcol etilico a 95° il rubinetto e la zona circostante. Infine flambare con una lampada bunsen e, aperto il rubinetto, far scorrere l'acqua a filo.

Nel rispetto scrupoloso dell'asepsi riempire le prime tre bottiglie sterili da 1000 mL fino a 2-3 cm dall'imboccatura.

Le operazioni di prelievo devono essere ripetute altre due volte a distanza di 10 minuti da un prelievo all'altro.

Costituire tre aliquote omogenee ciascuna composta da tre bottiglie da 1000 mL, ricordando che ogni aliquota deve essere composta da una bottiglia di ciascuna serie di prelievo (vedi schema operativo di prelievo).

2.1.3 Schema operativo di prelievo



Una delle aliquote sarà consegnata al responsabile della sorgente mentre le altre saranno trasportate al laboratorio per le analisi.

Il prelievo dell'acqua imbottigliata è effettuato dal personale del dipartimento della prevenzione della ASL di competenza del territorio.

Il trasporto dei campioni è fatto con cassetta coibentata munita di batterie di ghiaccio, le prove microbiologiche devono iniziare prima possibile, entro comunque il periodo di validità commerciale del prodotto.

Il campione è conservato a $+4 \pm 2^\circ\text{C}$.

L'aliquota da analizzare è riunita, al momento della prova, in un pallone sterile munito di tappo in cotone da 5 litri. Agitare il contenuto con movimenti rotatori.

Se l'acqua da analizzare è gassata o effervescente naturale aggiungere circa 200 g di palline di vetro sterili e l'agitazione deve proseguire fino ad ottenere una efficace degassificazione.

2.1.4 Tempi massimi e accettabili raccomandati per la conservazione dei campioni di acque per analisi microbiologiche

Microrganismi	Tempo massimo in ore	Tempo accettabile in ore
Organismi vitali a 22 °C o 36 °C	8	12
<i>Escherichia coli</i> e coliformi	12	18
Enterococchi	12	18
Batteri e spore di Clostridi solfito riduttori	48	72
Salmonella e altre Enterobacteriaceae	12	18
Staphylococcus	8	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	12
Legionella	48	72
Campilobacter	6	8

Da "Metodi analitici per le acque" manuale APAT IRSA-CNR 29/2003

2.2 Schemi di diagnostica batteriologica

2.2.1 Ricerca Legionella spp. Campionamento e prelievo (Documento 04.04.2000 G.U. n.103 5.5.2000 Alleg. 2)

Campionamento

- Acqua fredda o calda
- Depositi in serbatoi
- Incrostazioni in tubature e depositi
- Tamponi effettuati su rubinetti ecc.
- Acqua di condensa degli impianti di aria condizionata
- Filtri di impianti di alimentazione
- Acqua di sgocciolamento da torri di raffreddamento

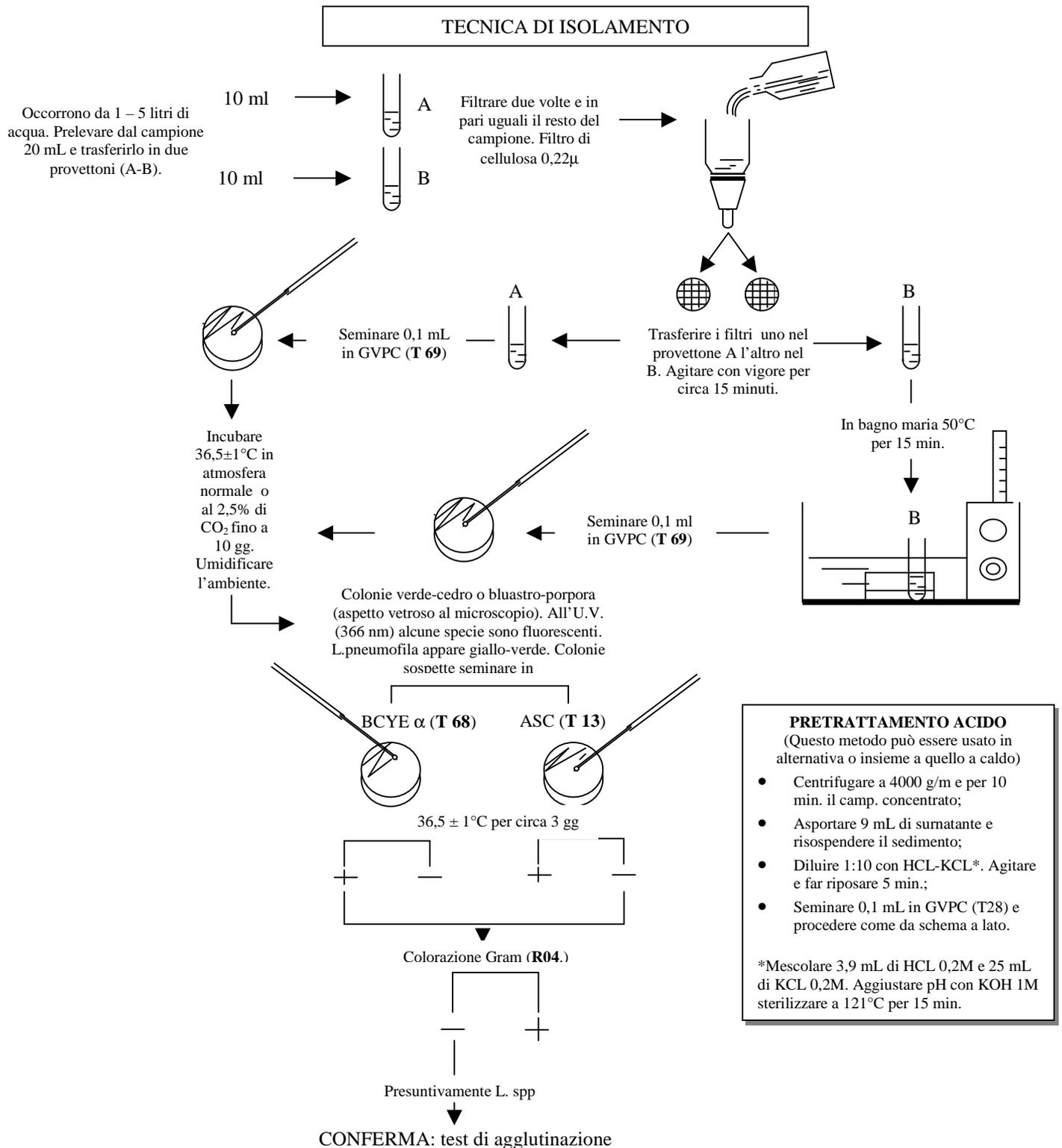
Prelievo

ACQUA	Da 1 a 5 litri raccolta in recipienti sterili. Se acqua clorata aggiungere tiosolfato di sodio (soluz. al 10% 0,1 per 100 mL di acqua). Flambare il punto di prelievo, dopo aver fatto scorrere l'acqua per almeno 5 minuti, solo se si desidera esaminare l'acqua dell'intero impianto.
DEPOSITI	Prelevare l'acqua dallo scarico o quella dal fondo dopo averlo sufficientemente svuotato.
INCROSTAZIONI	Raccogliere il materiale da tubi o serbatoi in recipienti sterili.
TAMPONI	Raccogliere il materiale da superfici e trasferire i tamponi in apposite provette contenenti circa 5 mL di acqua dell'impianto stesso.
FILTRI	Depositarli in sacchetti di plastica.

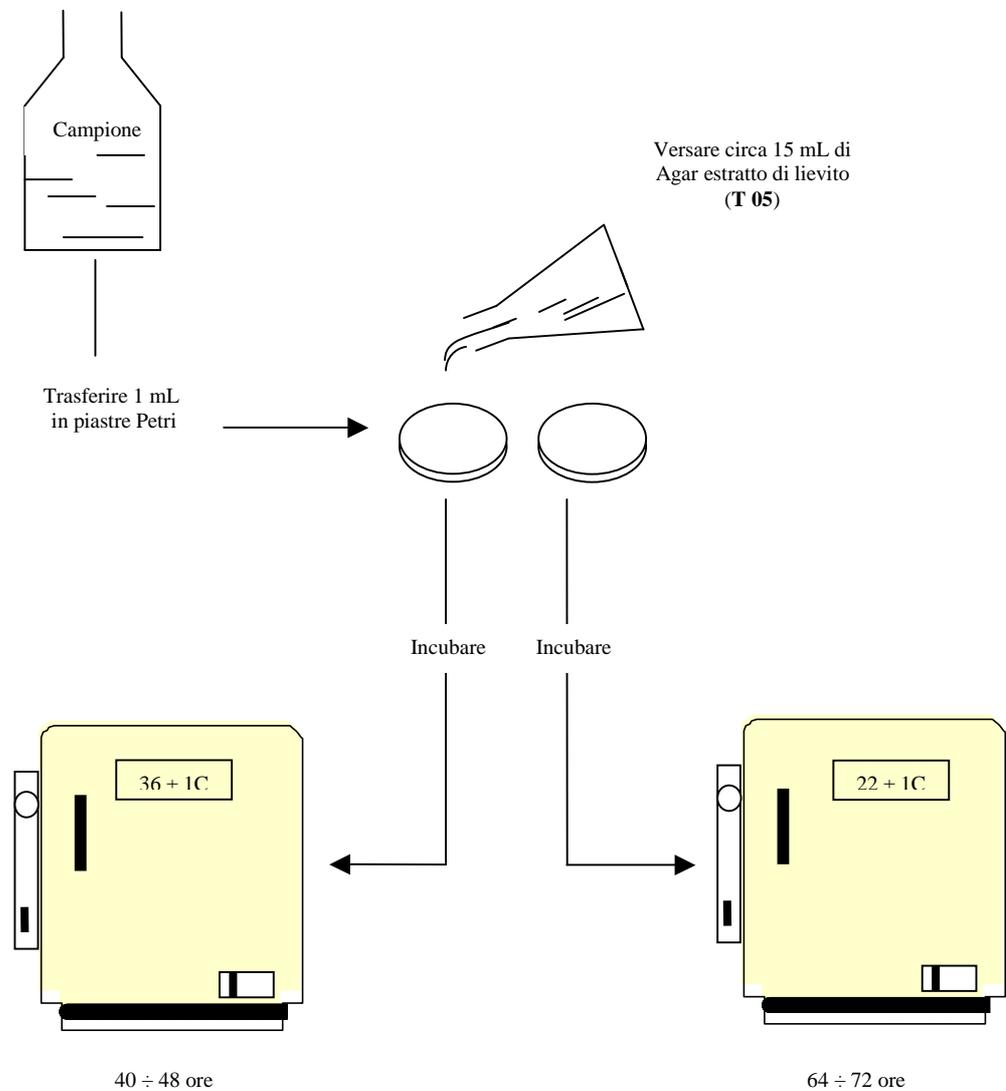
I campioni vanno conservati a temperatura ambiente, al riparo della luce e gli esami vanno iniziati entro 24 ore dal prelievo.

Ricerca Legionella

CARATTERISTICHE	Conosciute 6 diversi sierotipi e 22 specie tra cui: <i>L. micdadei</i> , <i>L. bazemaniai</i> , <i>L. dumoffii</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. jordanis</i> . Bacillo Gram – catalasi + ureasi- ossidasi ± gelatinasi (+ <i>L. micdadei</i> -) Crescita su agar-sangue e su BCYE-CF neg. su BCYE agar positiva. Necessita di cisteina per la crescita.
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Oltre alla forma classica può presentarne una a decorso benigno (“febbre di Pontiac”): La maggior parte delle patologie sono sostenute da <i>L. pneumophila</i> sintomi precoci: prostrazione, dolori muscolari, mal di testa, tosse secca febbre con brividi, dispnea, talvolta sintomi gastroenterici e dolori addominali. La <i>L.</i> può interessare oltre al polmone altri organi. Mortalità 15-20%.
HABITAT	Microrganismo ubiquitario presente sia nel terreno che in differenti habitat acquatici temp. 5,7 – 63°C. Isolato in serbatoi e condutture di acque, talvolta presente nell’acqua di condensa dei sistemi di condizionamento. Non ancora documentata la trasmissione inumana comunque è bene evitare contatti attraverso l’apparato respiratorio.



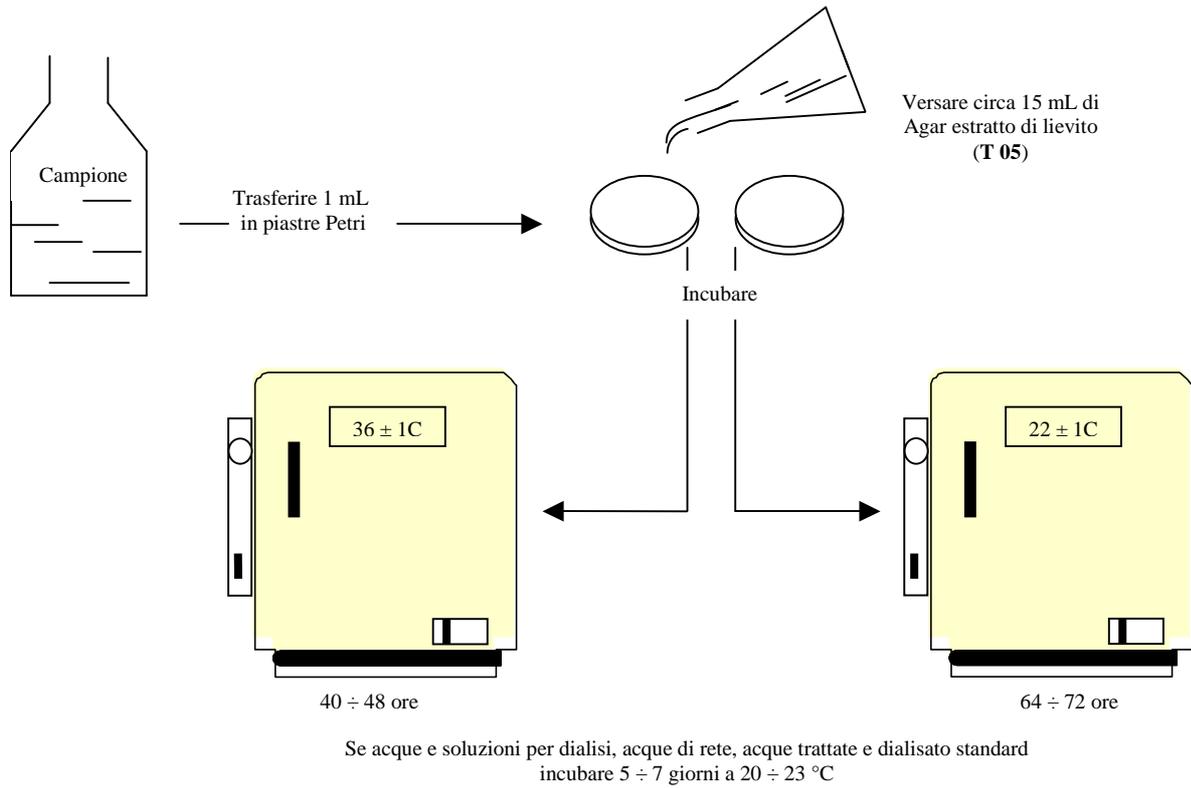
2.2.2 Determinazione della carica batterica a 22°C e 36°C nelle acque ISO 6222:1999



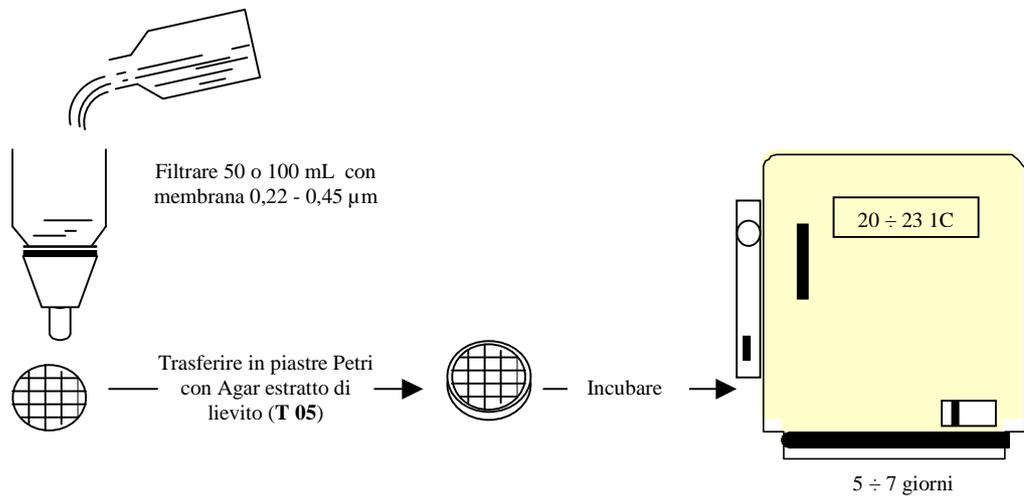
Espressione dei risultati

I risultati sono espressi come numero di unità formanti colonie per mL (UFC/mL) del campione riferito a ciascuna temperatura di incubazione. Se nelle piastre seminate non ci sono colonie esprimere il risultato come <1 UFC/mL. Se presenti più di 300 colonie nella diluizione maggiore esprimere il risultato o come >300 UFC/mL, o solamente come valore approssimato.

2.2.3 Conteggio delle colonie su agar a 22°C e 37°C
Rapporti ISTISAN 07/5 - Riferimento metodo UNI EN ISO 6222:2001
(Acque per il consumo umano, di piscina, acque e soluzioni di dialisi)



Per definire "ultrapuri" le acque e i dialisati utilizzare la tecnica della filtrazione su membrana

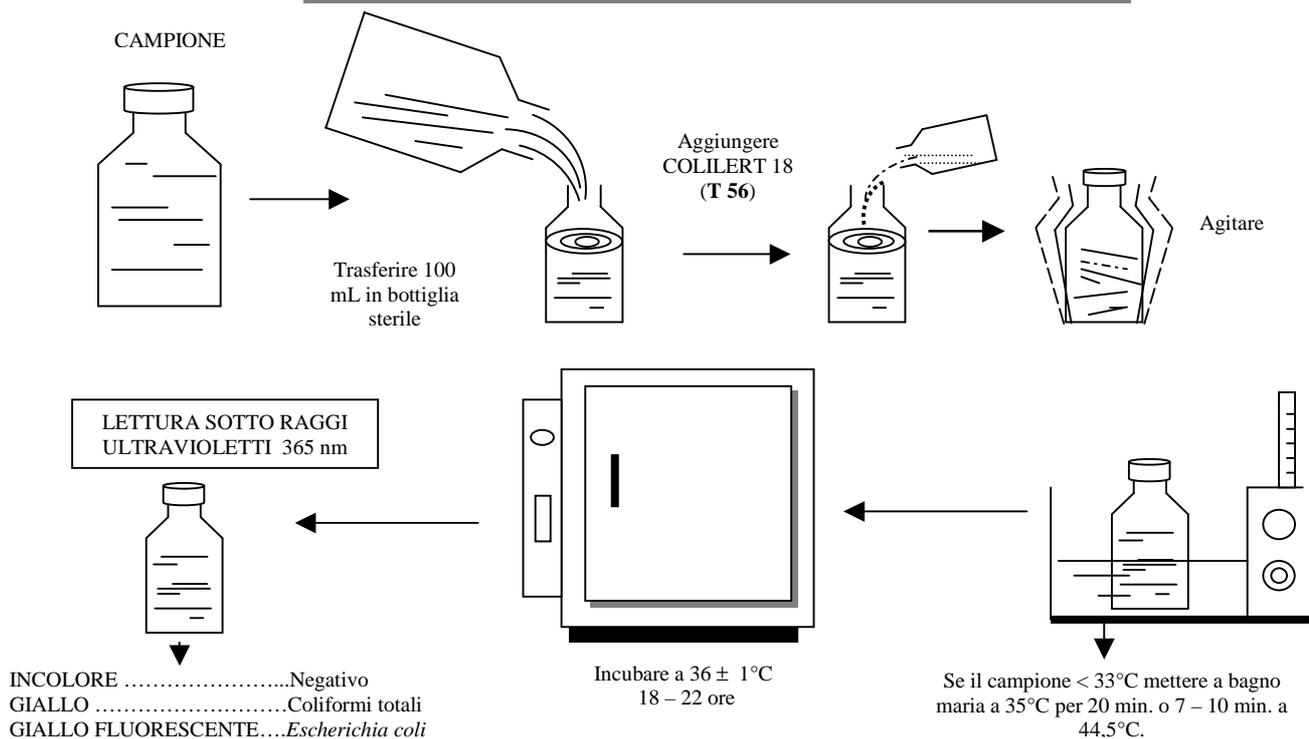


2.2.4 Determinazione dei batteri coliformi a 37°C - Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 006A

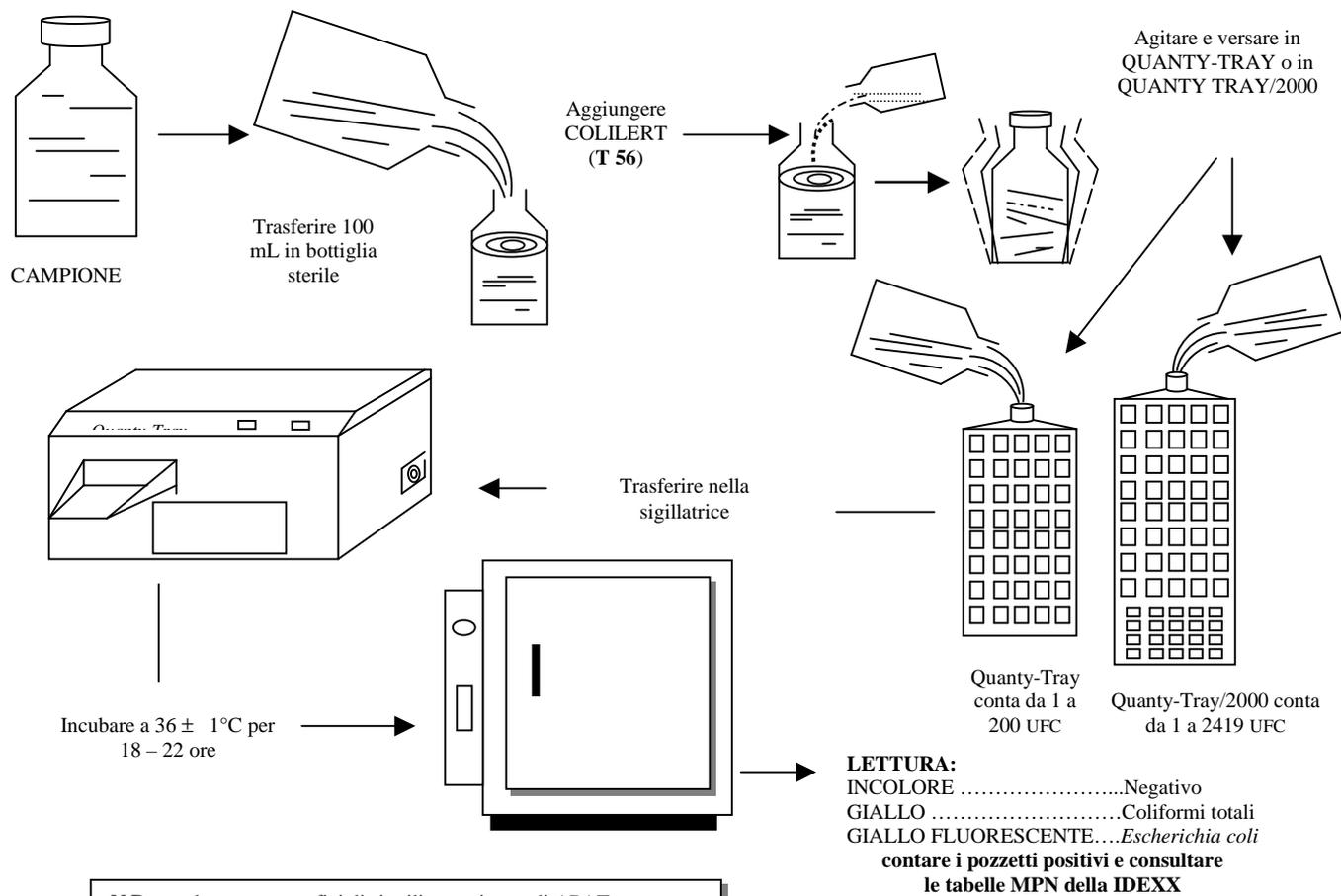
Escherichia coli - Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 001A

Numero più probabile MPN (COLILERT) su acque ad uso potabile

COLILERT 18 – Metodo qualitativo: Presenza / Assenza



Metodo quantitativo: Quanti-Tray e Quanti-Tray/2000

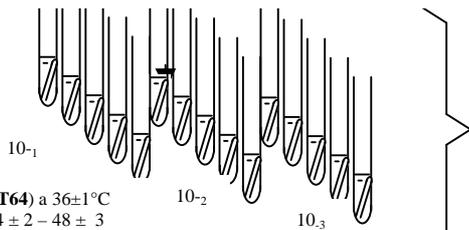


N.B.: per le acque superficiali si utilizzano i metodi APAT:

- Coliformi totali APAT CNR-IRSA 7010 B Man. 29:2003
- *Escherichia coli* APAT CNR-IRSA 7030 B Man. 29:2003

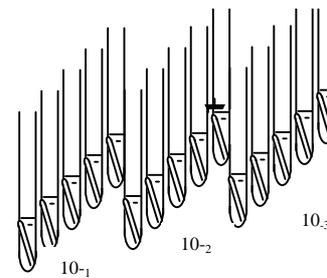
2.2.5 Coliformi totali - APAT CNR-IRSA 7010 Manuali e linee guida 29/2003 Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento

INOCULO con diluizioni di 10 mL, 1 mL, 0,1 mL
In una serie di 3 o 5 tubi. Come nell'esempio



BL (T64) a $36 \pm 1^\circ\text{C}$
 $24 \pm 2 - 48 \pm 3$
In alternativa Brodo
lauril triptosio (T33)

Tubi con crescita batterica e
produzione di gas trasferire 0,1
mL in BGB per conferma (T 24)

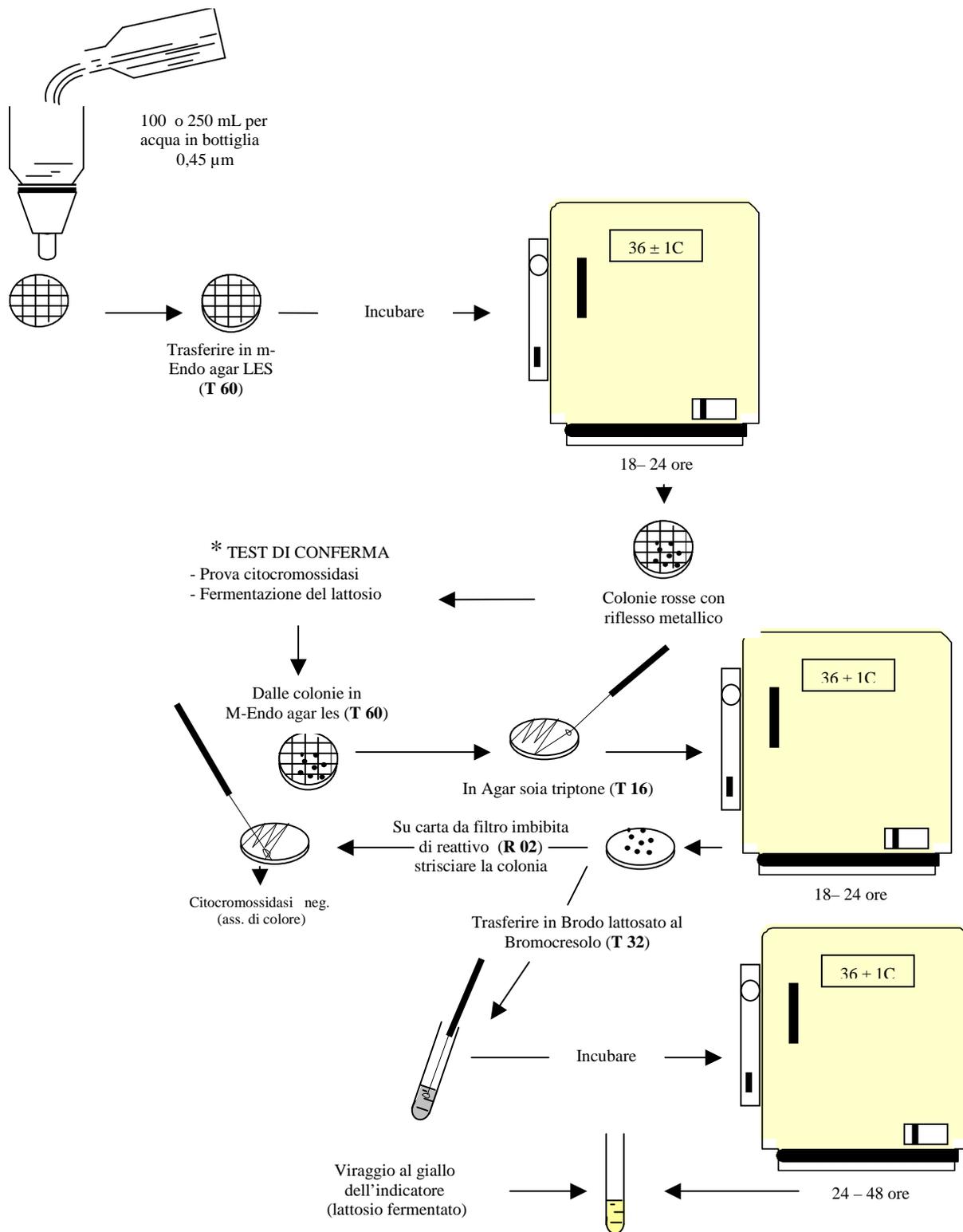


Tubi positivi (torbidità e gas) calcolare il valore dell'indice MPN
riferito a 100 mL sulla base delle combinazioni ottenute
consultando la tabella sotto riportata

$36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 - 48 h

Indice MPN e limite confidenza al 95% combinazioni di risultati con serie di 3 tubi o di 5 tubi diluizioni di 10 ml, 1 ml, 0,1 ml						
Tubi positivi	3 tubi MPN /100 mL	Limiti di confidenza al 95%		5 tubi MPN /100 mL	Limiti di confidenza al 95%	
		Inferiore	Superiore		Inferiore	Superiore
0-0-0	< 3			<2		
0-0-1	3	<0,5	9	2	<0,5	7
0-1-0	3	<0,5	13	2	<0,5	7
0-2-0				4	<0,5	11
1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0,5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0,5	15
1-2-0	11	3	3	6	<0,5	15
2-0-0	9	1	36	4	<0,5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150			
2-3-0				12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380			
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380			
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470			
3-3-0	240	36	1300			
3-3-1	460	71	2400			
3-3-2	1100	150	4800			
3-3-3	>=2400					
4-0-0				13	3	31
4-0-1				17	5	46
4-1-0				147	5	46
4-1-1				21	7	63
4-1-2				26	9	78
4-2-0				22	7	67
4-2-1				26	9	78
4-3-0				27	9	80
4-3-1				33	11	93
4-4-0				34	12	93
5-0-0				23	7	70
5-0-1				31	11	89
5-0-2				43	15	110
5-1-0				33	11	93
5-1-1				46	16	120
5-1-2				63	21	150
5-2-0				49	17	130
5-2-1				70	23	170
5-2-2				94	28	220
5-3-0				79	25	190
5-3-1				110	31	250
5-3-2				140	37	340
5-3-3				180	44	500
5-4-0				30	35	300
5-4-1				170	43	490
5-4-2				220	57	700
5-4-3				280	90	850
5-4-4				350	120	1000
5-5-0				240	68	750
5-5-1				350	120	1000
5-5-2				540	180	1400
5-5-3				920	300	3200
5-5-4				600	640	5800
5-5-5				>=2400		

2.2.6 Determinazione dei batteri coliformi a 37°C
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 006B Rev. 00
(Acque per il consumo umano, di piscina, acque e soluzioni di dialisi)



ESPRESSIONE DEL RISULTATO

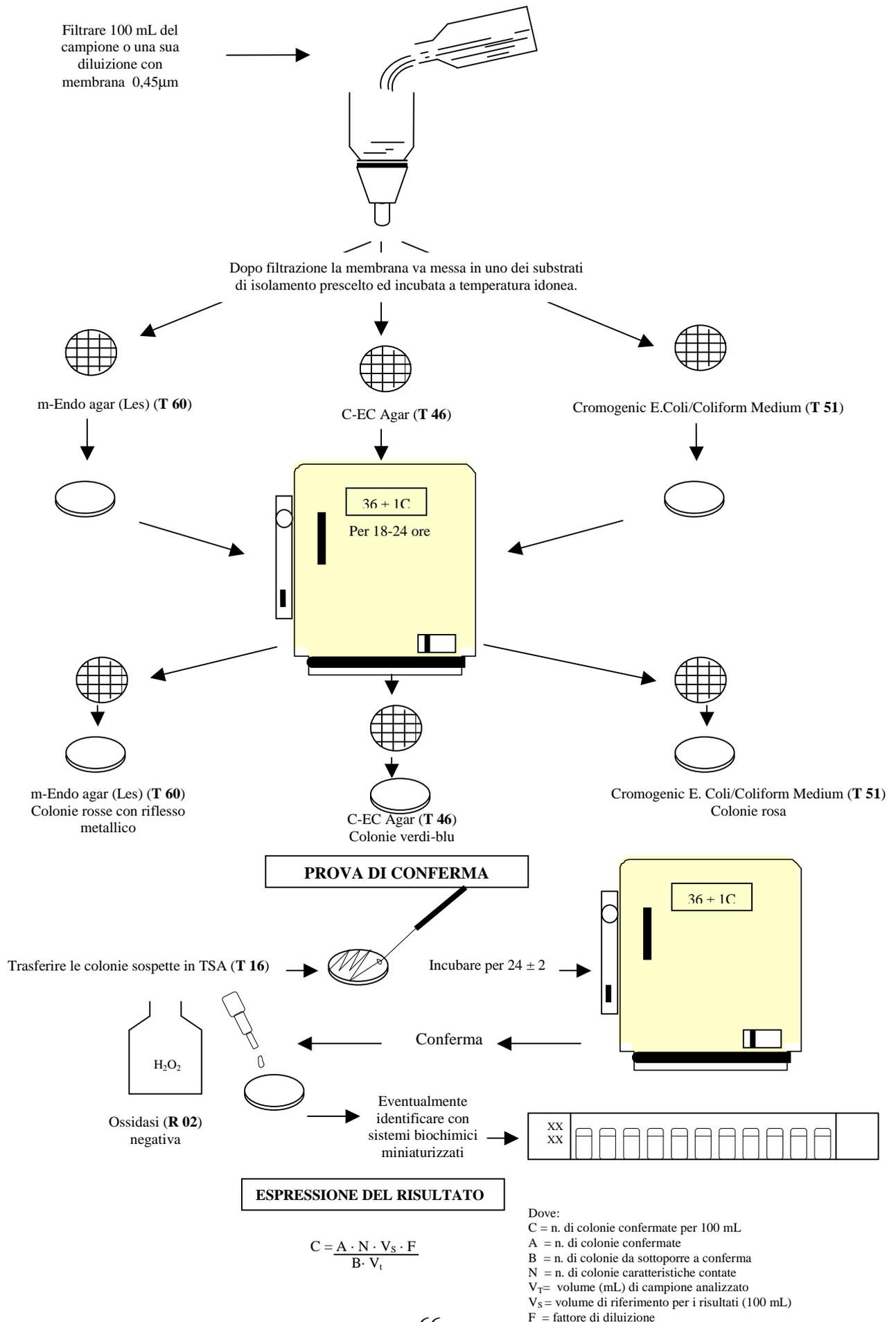
$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_i}$$

Dove:
 C = n. di colonie confermate per 100 mL
 A = n. di colonie confermate
 B = n. di colonie da sottoporre a conferma
 N = n. di colonie caratteristiche contate
 V_i = volume (mL) di campione analizzato
 V_s = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
 F = fattore di diluizione

***N.B.** in alternativa la prova di conferma può essere effettuata con sistemi miniaturizzati disponibili in commercio

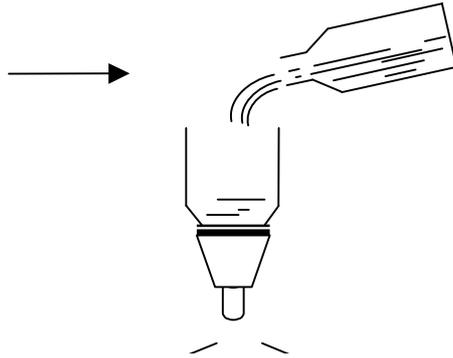
2.2.7 Coliformi totali - Metodo membrane filtranti (MF) APAT CNR-IRSA 7010C Manuali e linee guida 29/2003

Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento



2.2.8 Coliformi fecali - Metodo membrane filtranti APAT CNR- IRSA 7020B
Manuali e linee guida 29/2003
Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento

Filtrare 100 mL del campione o una sua diluizione con membrana 0,45µm



Dopo filtrazione la membrana va messa in uno dei substrati di isolamento prescelto ed incubata a temperatura idonea.



m-FC Agar (T 61)



m-FC Agar (T 61)

Colonie blu con sfumature di colore. Alcuni E. coli colonie atipiche giallo chiaro

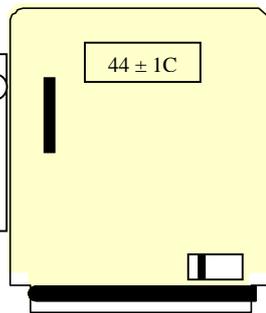


C-EC Agar (T 46)



C-EC Agar (T 46)

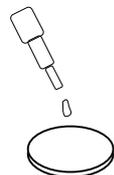
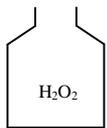
Colonie verdi-blu



Per 18-24 ore

PROVA DI CONFERMA

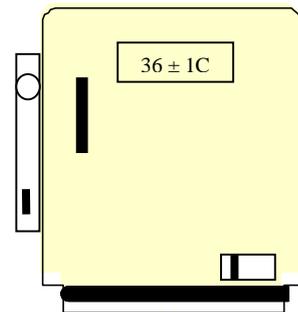
Trasferire le colonie sospette in Agar soia triptone (T 16)



Citromossidasi (R 02)
negativa



Incubare per 24 ± 2 h



Conferma

Eventualmente identificare con sistemi biochimici miniaturizzati



ESPRESSIONE DEL RISULTATO

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_S \cdot F}{B \cdot V_t}$$

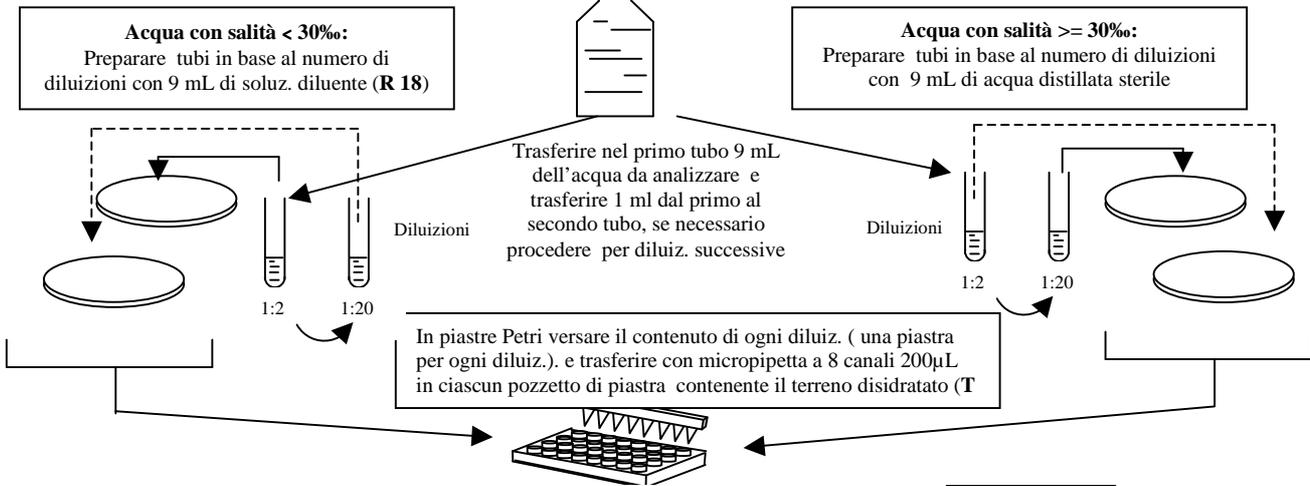
Dove:
 C = n. di colonie confermate per 100 mL
 A = n. di colonie confermate
 B = n. di colonie da sottoporre a conferma
 N = n. di colonie caratteristiche contate
 V_t = volume (mL) di campione analizzato
 V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
 F = fattore di diluizione

2.2.9 Ricerca *Escherichia coli* APAT CNR- IRSA 7030
Manuali e linee guida 29/2003

Acque superficiali, di fiume, di lago, reflue anche trattate e acque con materiale in sospensione

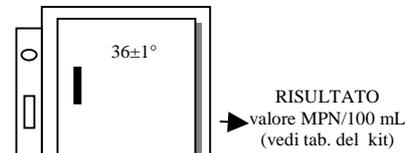
CAMPIONE

Metodo A (Norma ISO 9308-3 1998)

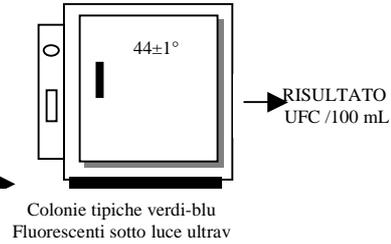


Incubare a 44±1°C per 36 max 72 ore Positivi i pozzetti che sotto la luce ultravioletta sono blu-fluorescenti

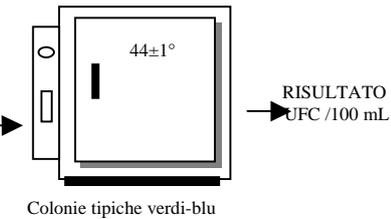
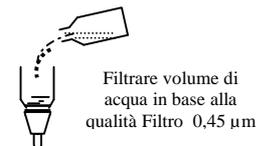
Metodo B



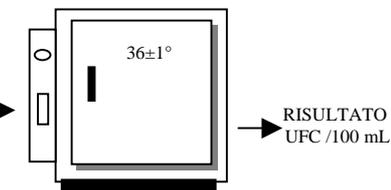
Metodo C



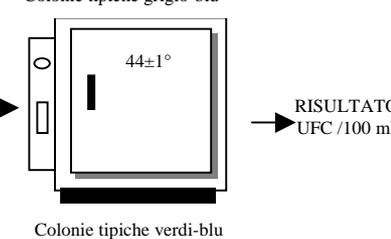
Metodo D



Metodo E

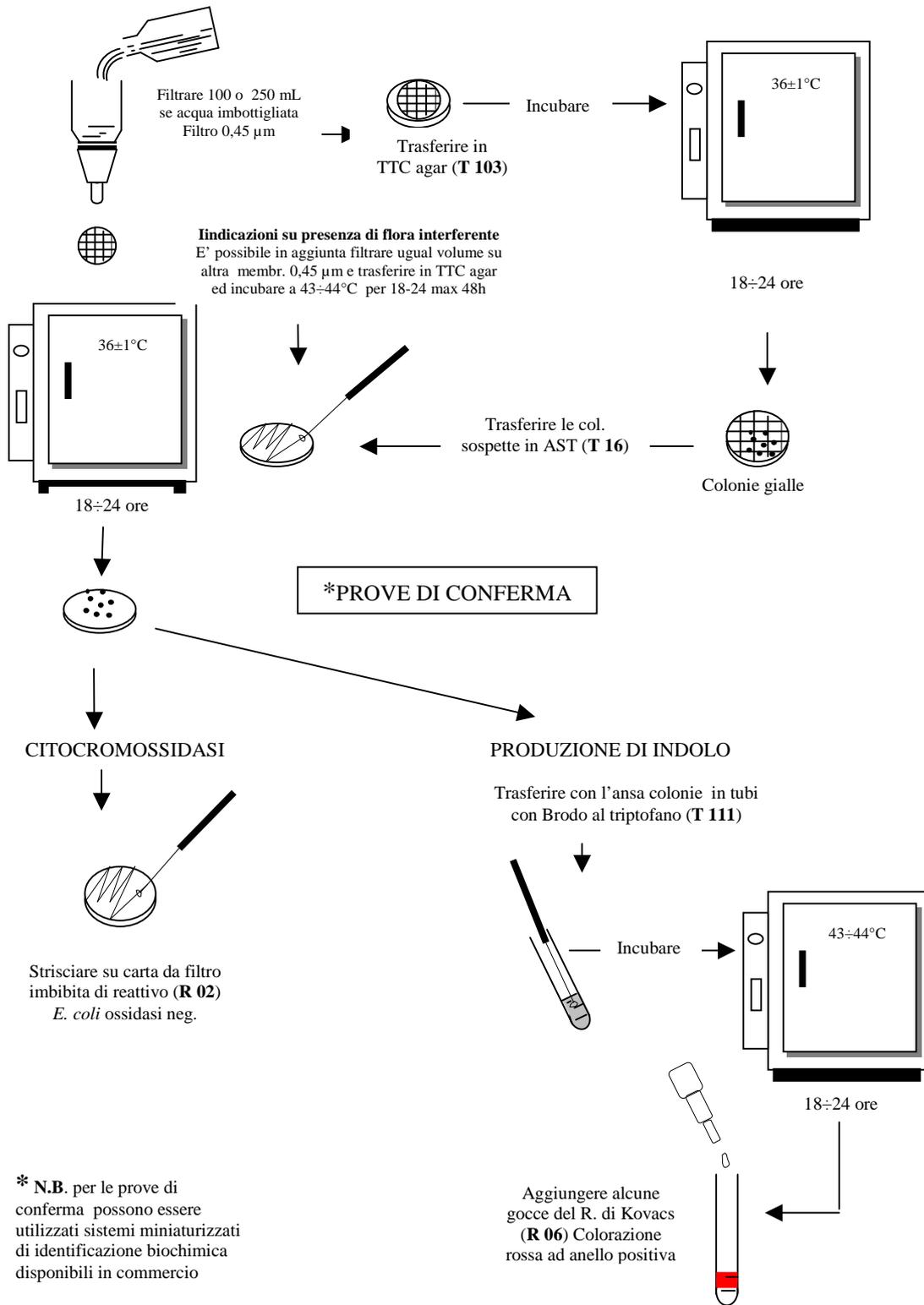


Metodo F



Metodi: **A** acque superficiali, reflue, con materiale in sospensione
B acque poco o mediamente contaminate, *E.coli* danneggiati
C acque trattate o poco contaminate
D acque reflue e superficiali
E acque trattate, *E coli* danneggiati
F acque superficiali dolci o marine e acque reflue

2.2.10 Determinazione di *Escherichia coli* (prova normalizzata)
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 001B Rev. 00 Rif. UNI EN ISO 9308-1:2002



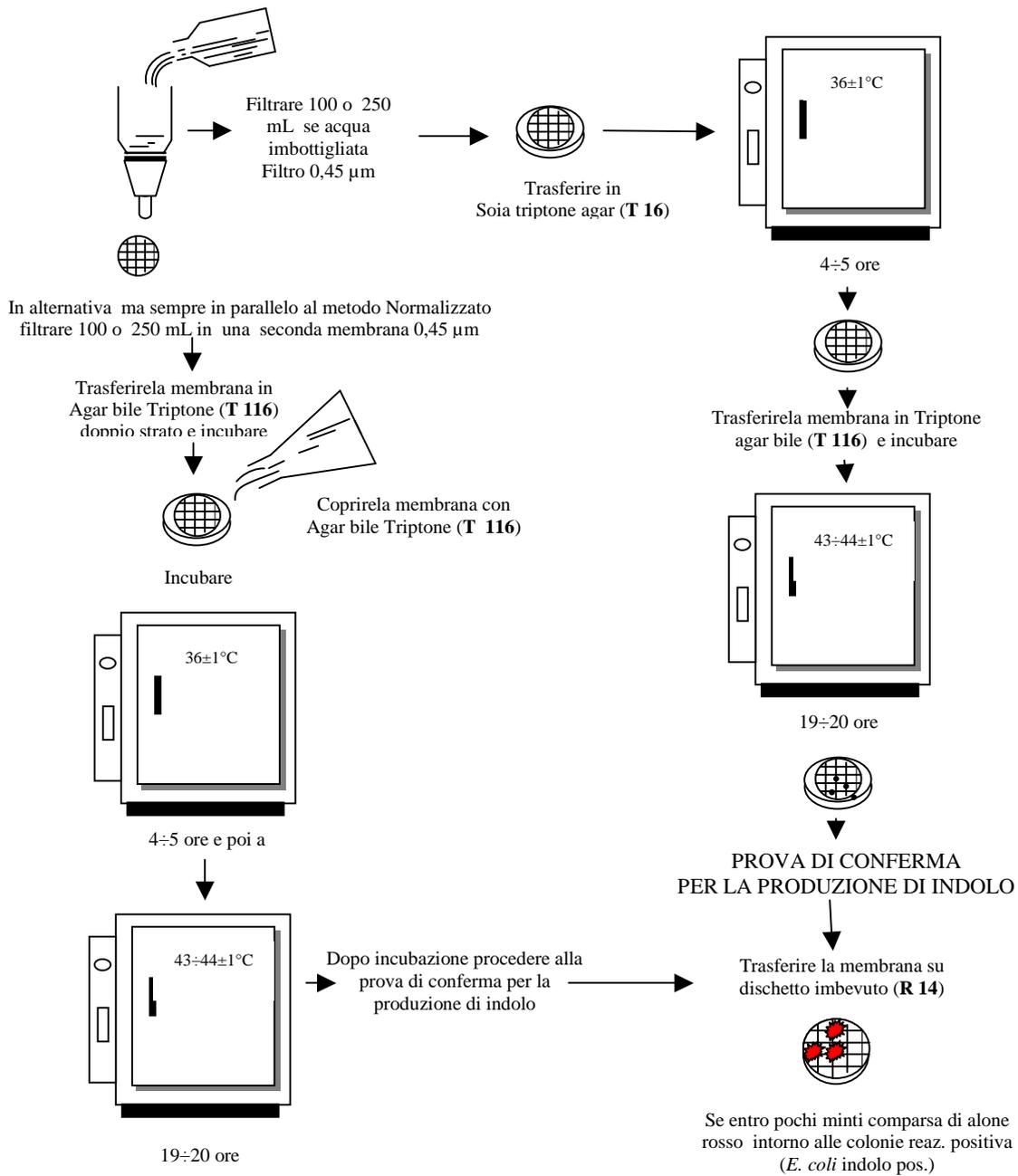
ESPRESSIONE DEL RISULTATO

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_S \cdot F}{B \cdot V_t}$$

Dove:

- C = n. di colonie confermate per 100 mL
- A = n. di colonie confermate
- B = n. di colonie da sottoporre a conferma
- N = n. di colonie caratteristiche contate
- V_T = volume (mL) di campione analizzato
- V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
- F = fattore di diluizione

2.2.11 Determinazione di *Escherichia coli* (prova rapida)
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 001C Rev. 00 Rif. UNI EN ISO 9308-1:2002
(La prova può essere effettuata solamente in parallelo con la prova normalizzata ISS A 001B Rev.00)



ESPRESSIONE RISULTATI

Confrontare i risultati con la prova normalizzata effettuata in parallelo. Considerare il numero di *E.coli* quello più alto confrontando i conteggi delle colonie confermate nelle due prove

N.B. la prova rapida non è consigliata se presenti troppe colonie nella membrana: la diffusione della colorazione rossa può comportare difficoltà di interpretazione dei risultati.

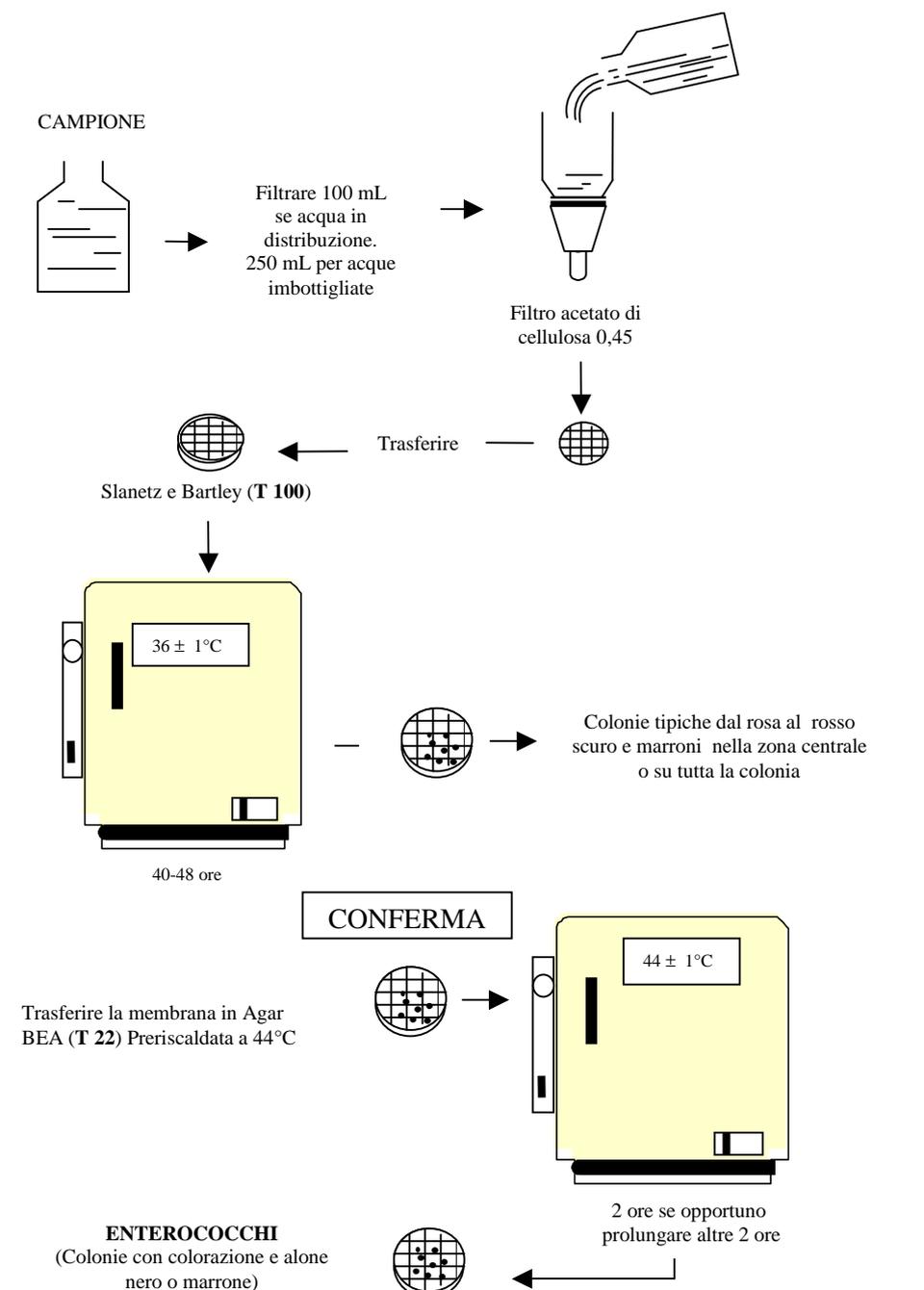
2.2.12 Determinazione degli enterococchi

Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 002 Rev. 00 (Riferimento UNI EN ISO 7899-2:2003)

CARATTERISTICHE Genere enteroc. 4 specie (*E. faecium*; *E. faecalis*; *E. avium*; *E. gallinarum*) Termofili Gram + catalasi – di forma sferica riunite in catenelle di 2 elementi, raramente più. Crescono in presenza di bile 40% idrolizzano l'esculina. Sviluppano in brodo a pH 9,6 con 6,5 di NaCl. Nella parete cellulare possiedono un complesso di acidi glicerolotecoici (A gruppo-specifico D) che li caratterizza. Abitatori dell'intestino dell'uomo e degli animali sono diffusi nell'ambiente per la loro resistenza a condizioni sfavorevoli.

MANIFESTAZIONI CLINICHE Infezioni tratto urinario, ascessi pelvici. Peritoniti. Ferite infette. Endocarditi.

HABITAT Prodotti carnei. Salumi. Acqua. Verdure.

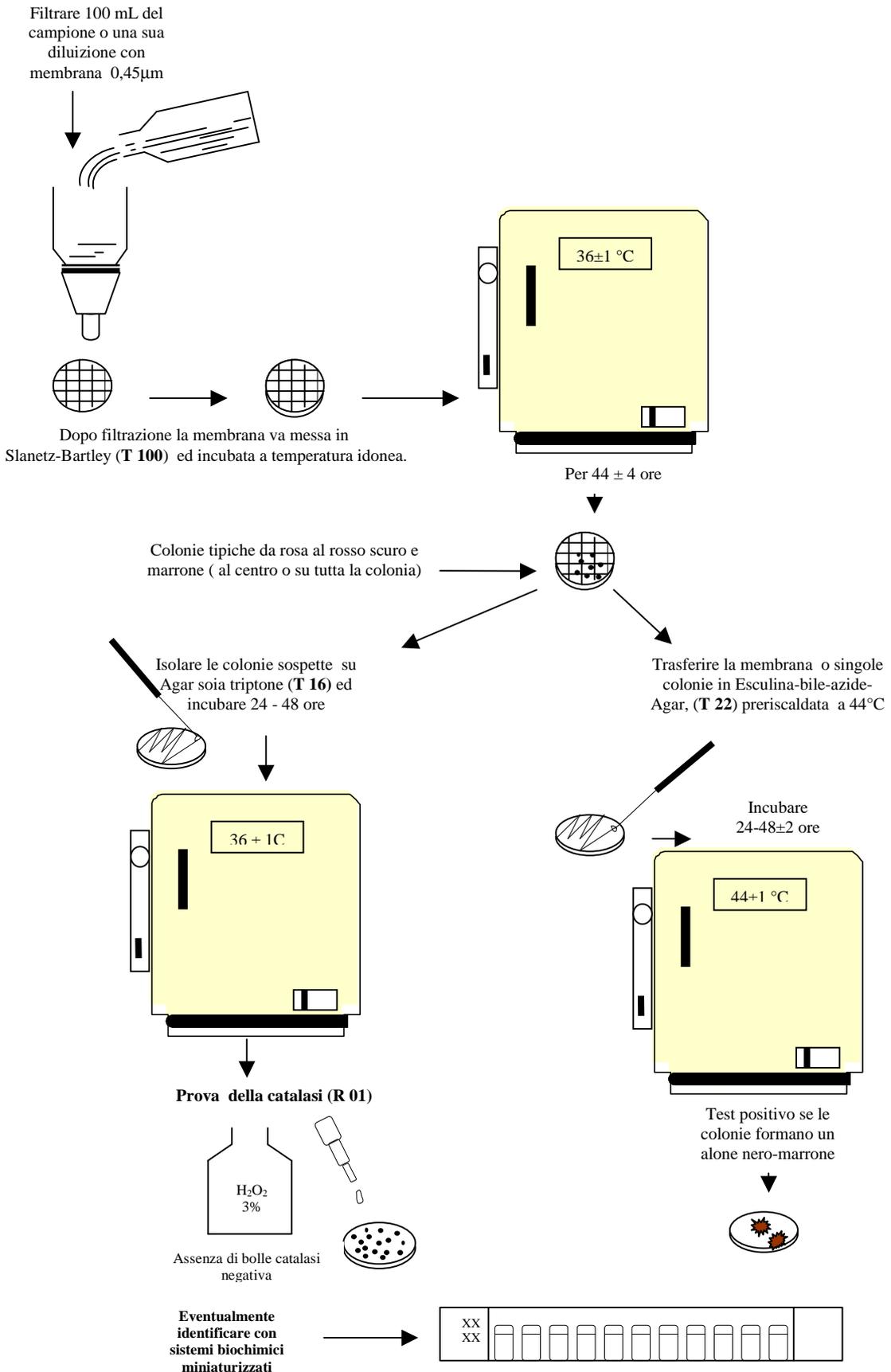


ESPRESSIONE DEI RISULTATI

$$C = \frac{A * N * V_s * F}{B * V_t}$$

C = n. colonie confermate per 100 mL
 A = n. colonie confermate
 B = n. colonie sottoposte a conferma
 N = n. colonie caratteristiche contate su membrana
 V_t = volume del campione analizzato (in mL)
 V_s = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
 F = fattore di diluizione

**2.2.13 Streptococchi fecali ed enterococchi - Metodo membrane filtranti
Manuali e linee guida APAT CNR-IRSA 7040 Man. 29/2003
(Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento)**

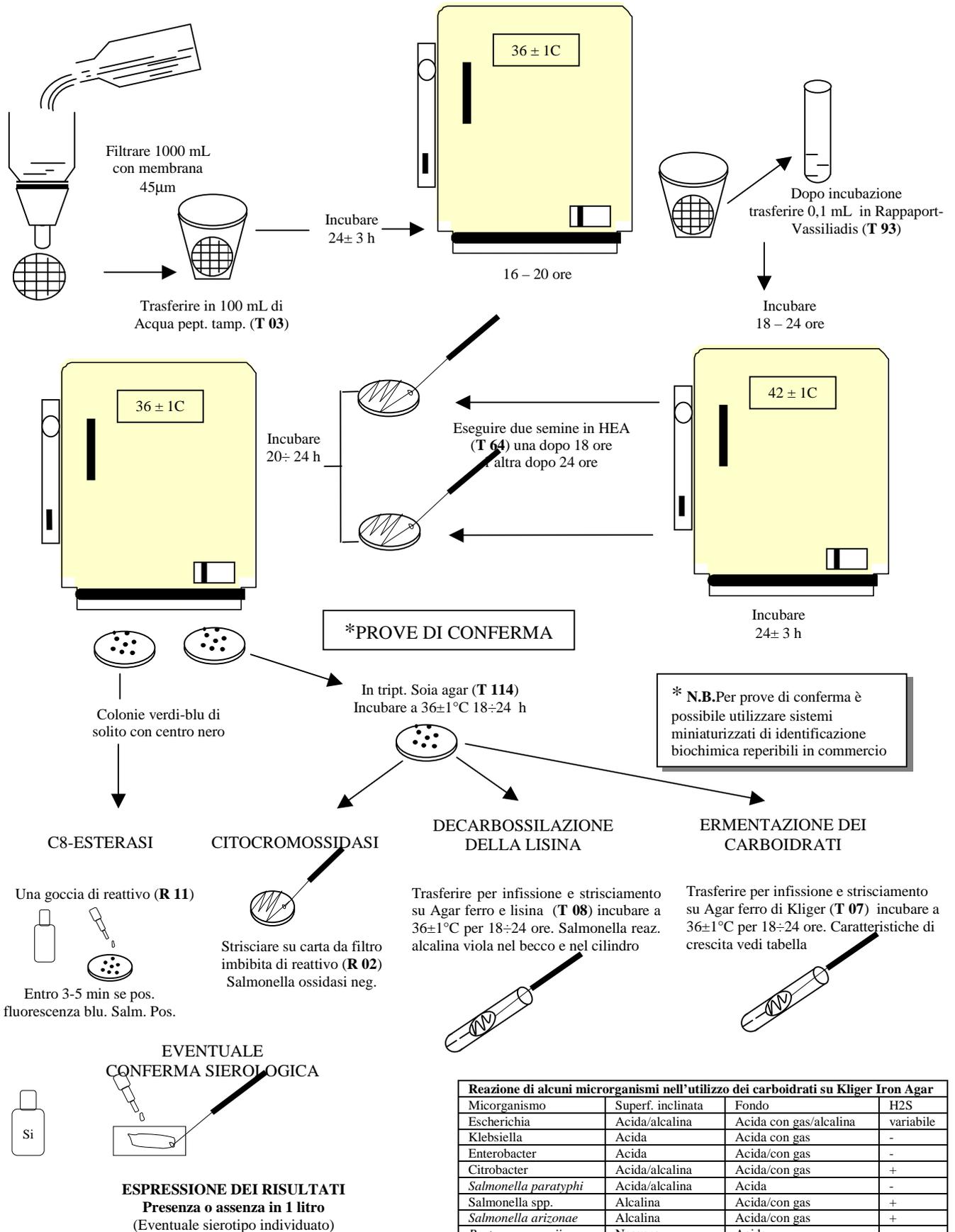


ESPRESSIONE DEL RISULTATO

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_S \cdot F}{B \cdot V_t}$$

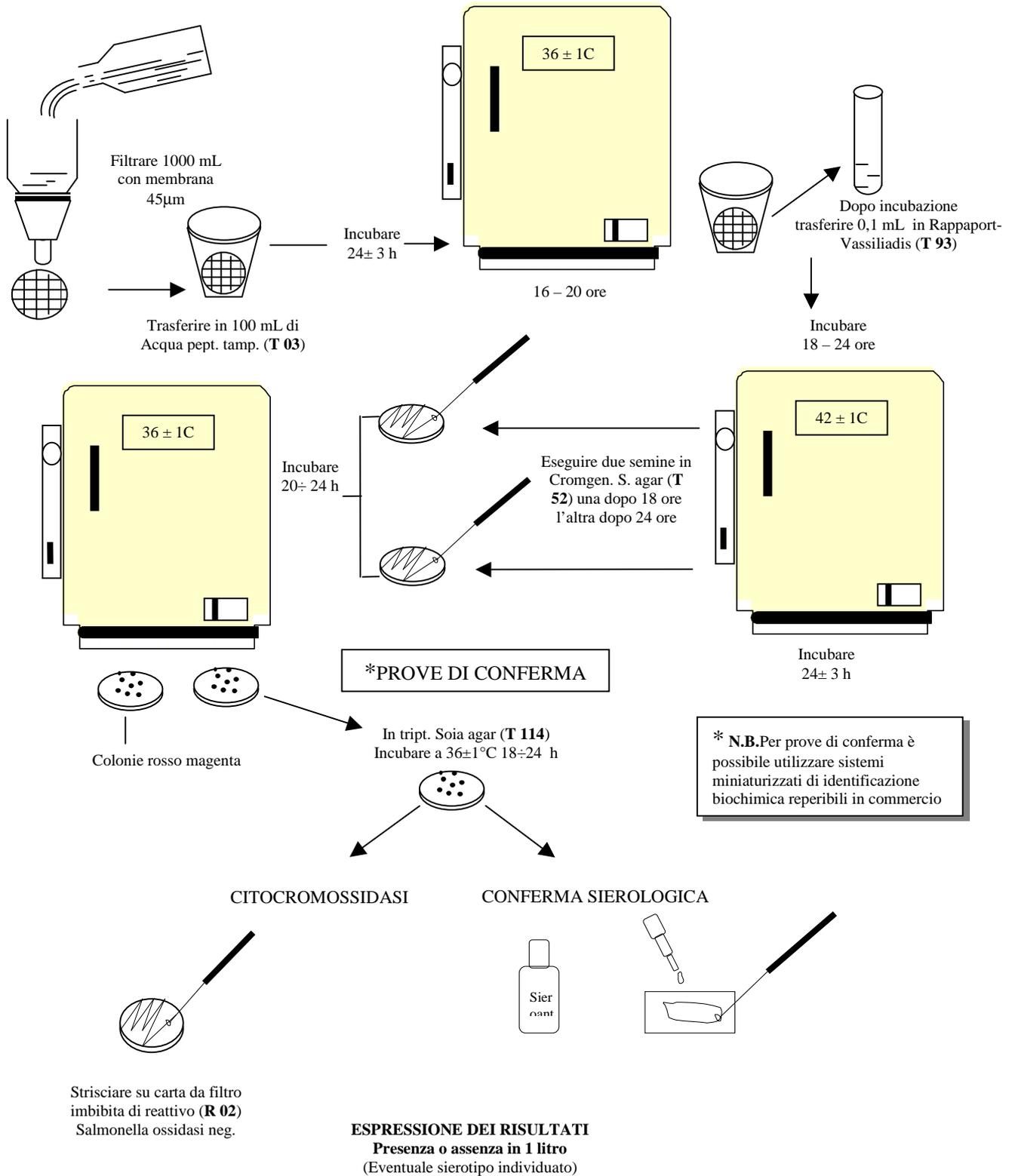
Dove:
 C = n. di colonie confermate per 100 mL
 A = n. di colonie confermate
 B = n. di colonie da sottoporre a conferma
 N = n. di colonie caratteristiche contate
 V_t = volume (mL) di campione analizzato
 V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
 F = fattore di diluizione

2.2.14 Determinazione degli enterobatteri patogeni: Salmonella
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 011A Rev. 00

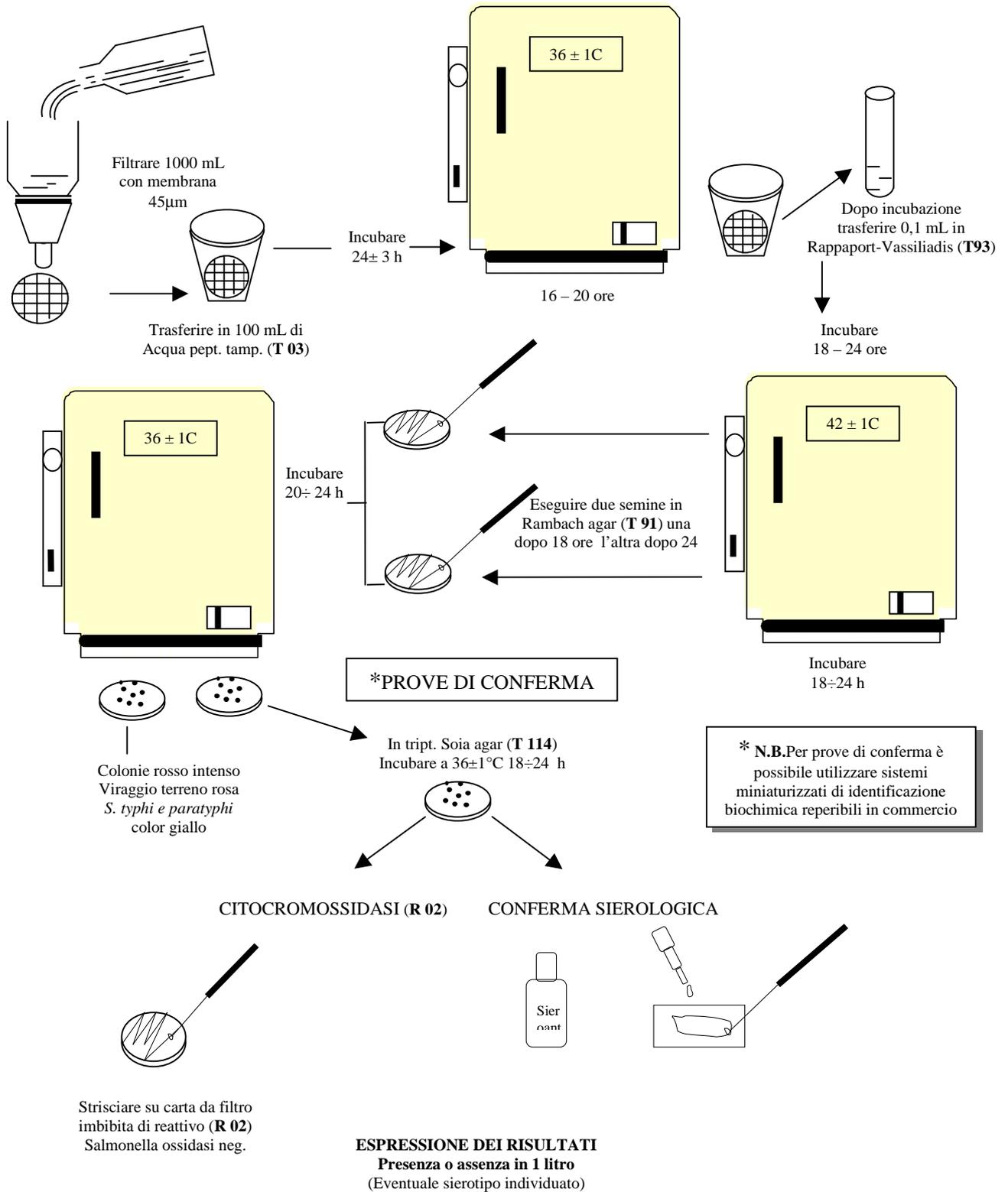


Micorganismo	Superf. inclinata	Fondo	H2S
Escherichia	Acida/alcalina	Acida con gas/alcalina	variabile
Klebsiella	Acida	Acida con gas	-
Enterobacter	Acida	Acida/con gas	-
Citrobacter	Acida/alcalina	Acida/con gas	+
Salmonella paratyphi	Acida/alcalina	Acida	-
Salmonella spp.	Alcalina	Acida/con gas	+
Salmonella arizonae	Alcalina	Acida/con gas	+
Proteus morganii	Nessuna	Acida	-
Proteus vulgaris	Nessuna	Acida	+
Shigella	Nessuna	Acida	-

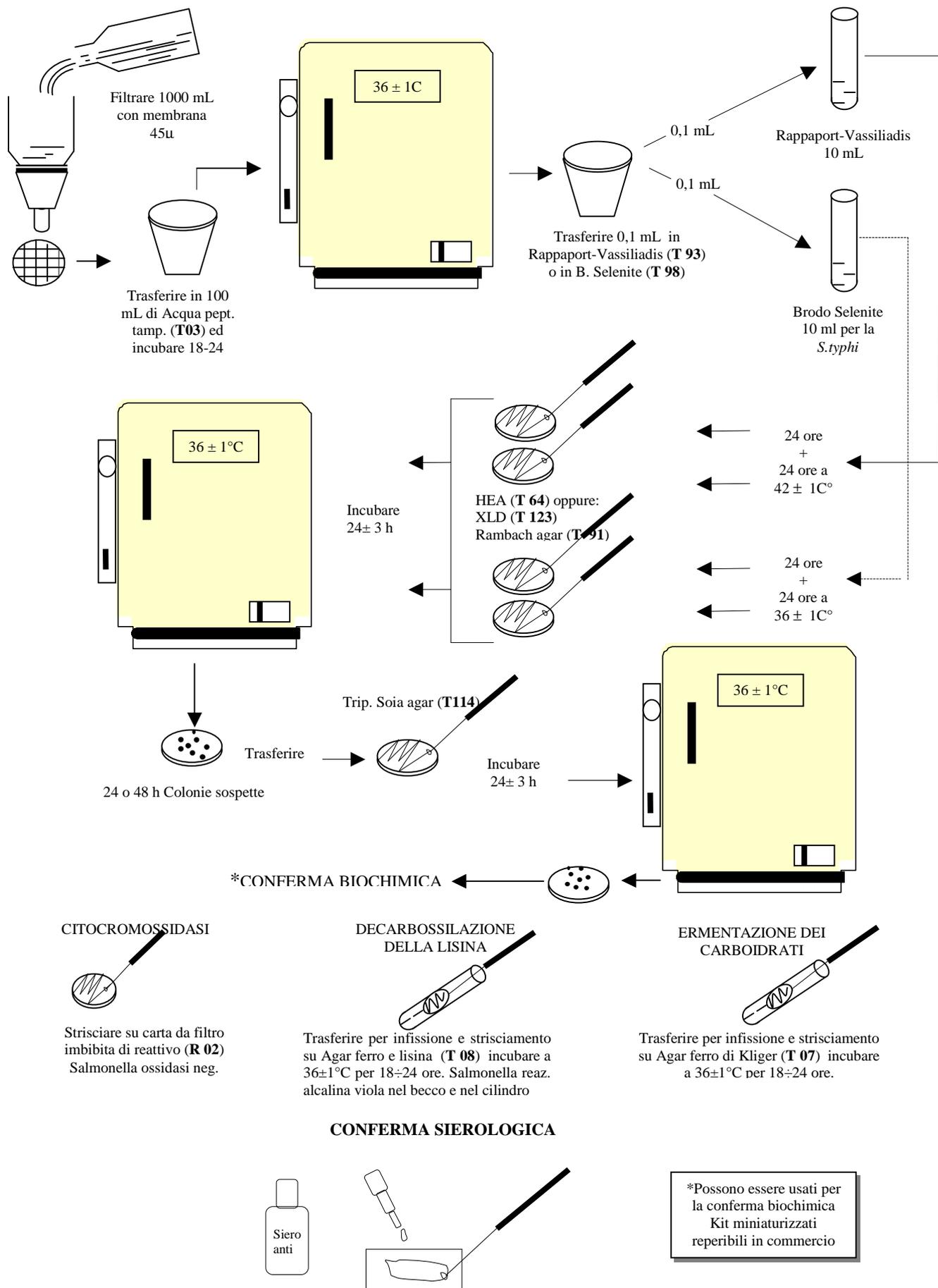
2.2.15 Determinazione degli enterobatteri patogeni: Salmonella
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 011B Rev. 00



2.2.16 Determinazione degli enterobatteri patogeni: Salmonella
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 011C Rev. 00



2.2.17 Ricerca Salmonella spp. su acque superficiali, di fiume, di lago, e su acque reflue sottoposte a trattamento
Manuali e linee guida APAT CNR - IRSA 7080 Man. 29-2003



2.2.18 Determinazione enterobatteri patogeni: Shigella Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 012A Rev.00

CARATTERISTICHE

Batteri bastoncellari si conoscono 4 specie (*Shigella dysenteriae*, *flexneri*, *boydii*, *sonnei*) famiglia enterobacteriaceae Gram – non mobili aerobi e anaerobi facoltativi, fermentano pochi carboidrati senza produz. di gas e idrogeno solforato.

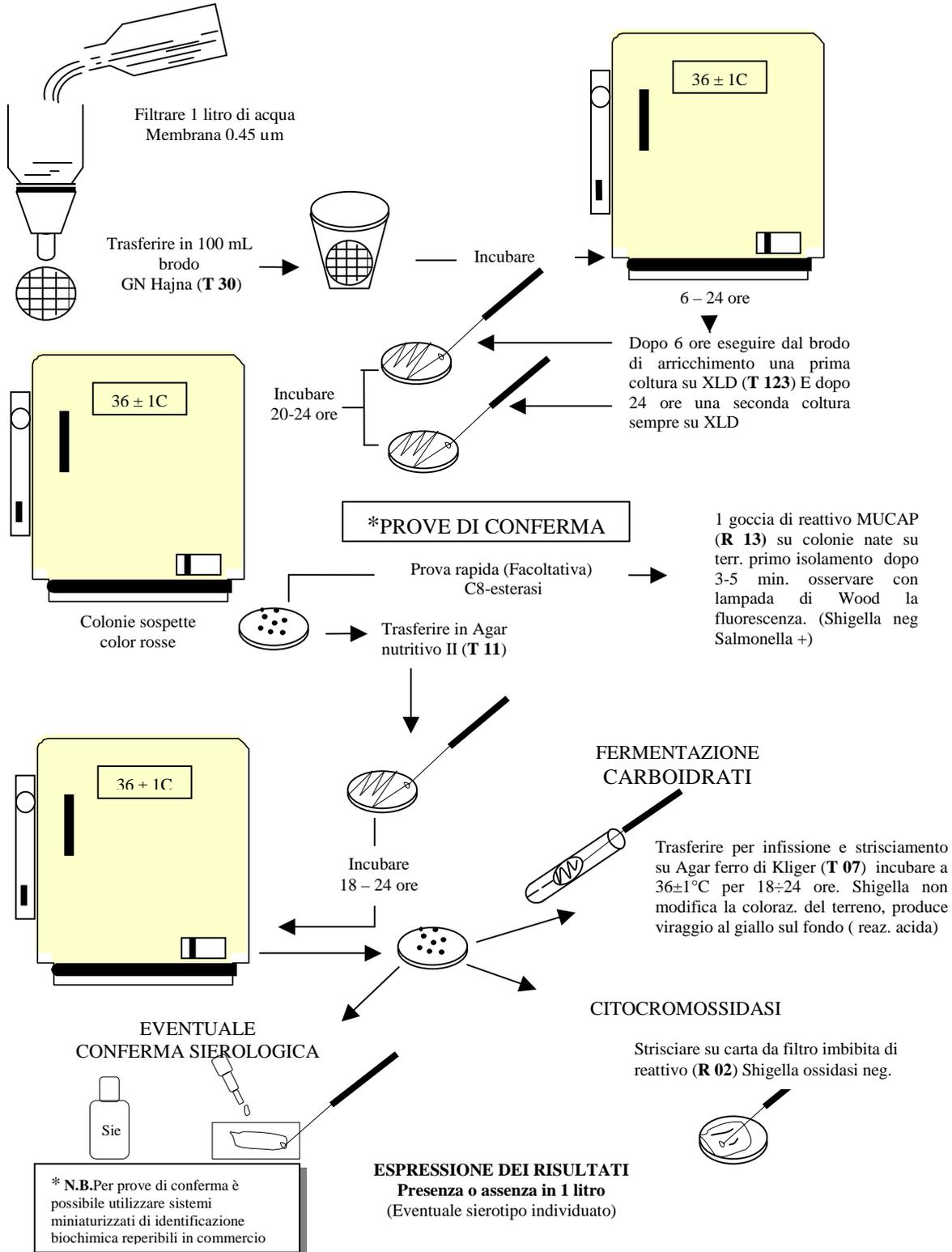
MANIFESTAZIONI CLINICHE

Patogeno per l'uomo agente eziologico della dissenteria bacillare. Infezione per contatto diretto o ingestione alimenti e acqua contaminata. Sintomi diarrea, nausea, vomito dopo 12 - 96 ore durata 4 - 7 giorni

HABITAT

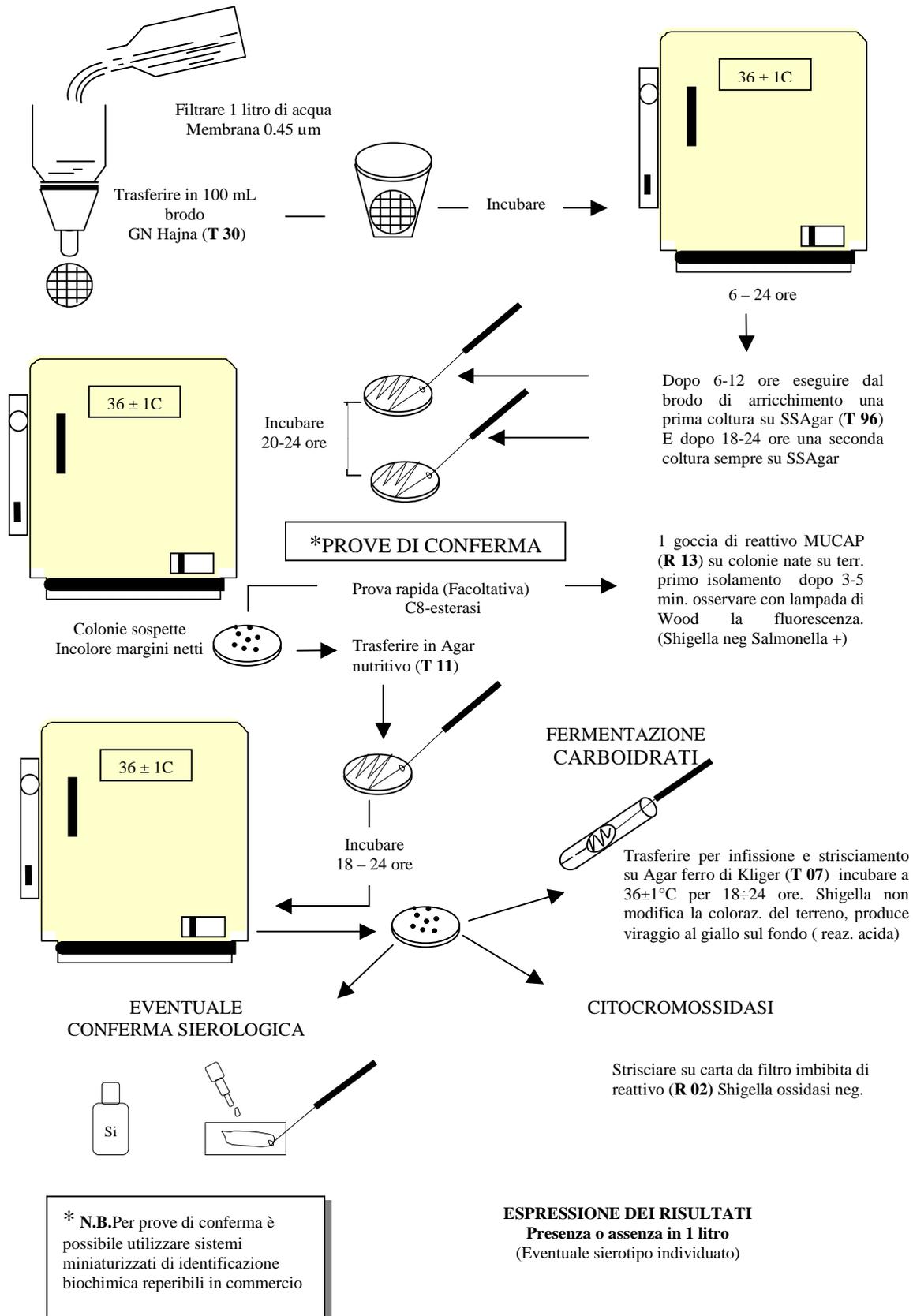
Acqua e cibi contaminati (es. latte).

La Shigella va ricercata nell'ambito della verifica del parametro Enterobatteri patogeni di cui all'avvertenza dell'Allegato I del D. Lgs n.31 del 2001 e s.m.i.



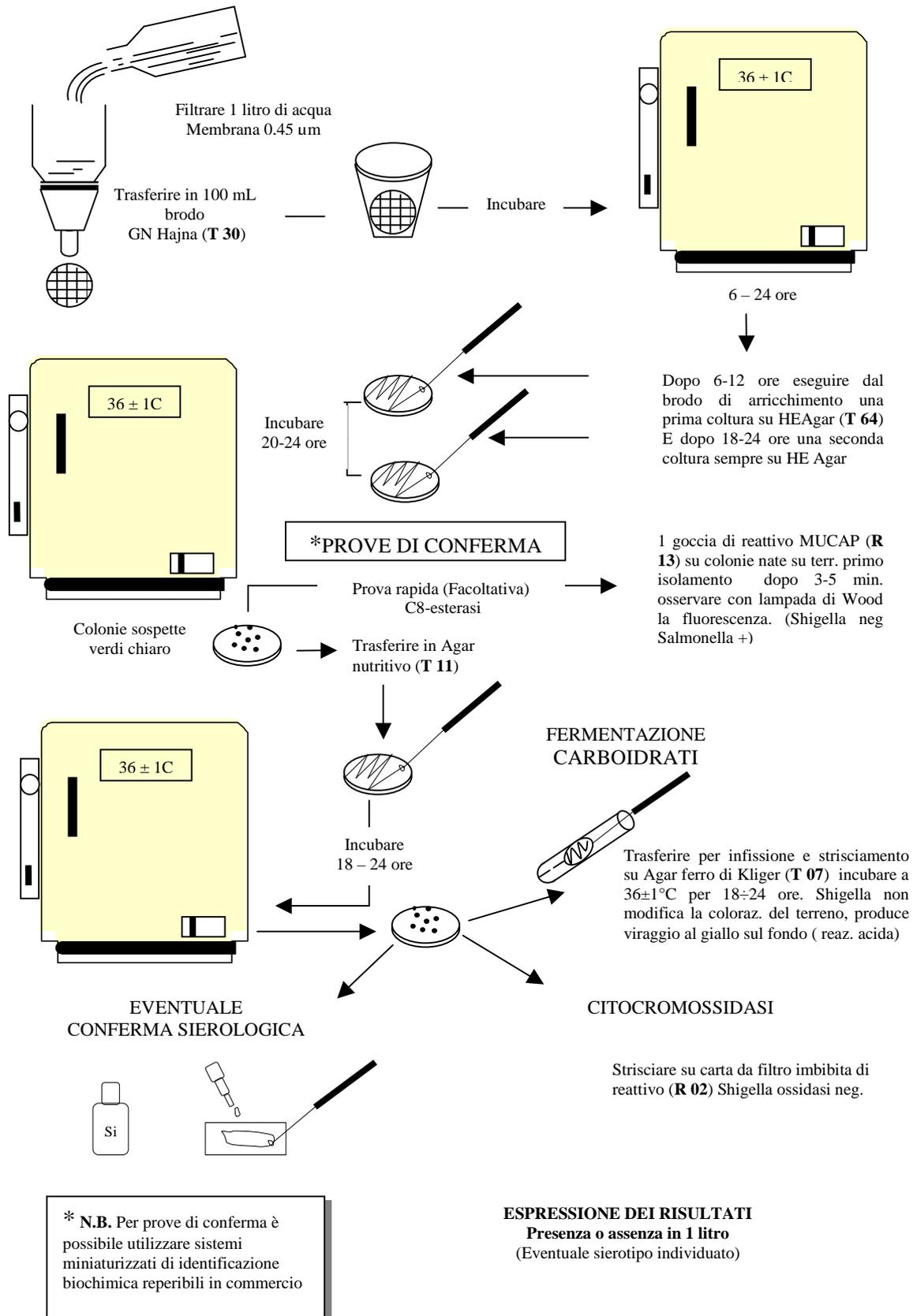
2.2.19 Determinazione enterobatteri patogeni: Shigella

Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 012B Rev.00



2.2.20 Determinazione enterobatteri patogeni: Shigella

Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 012C Rev.00



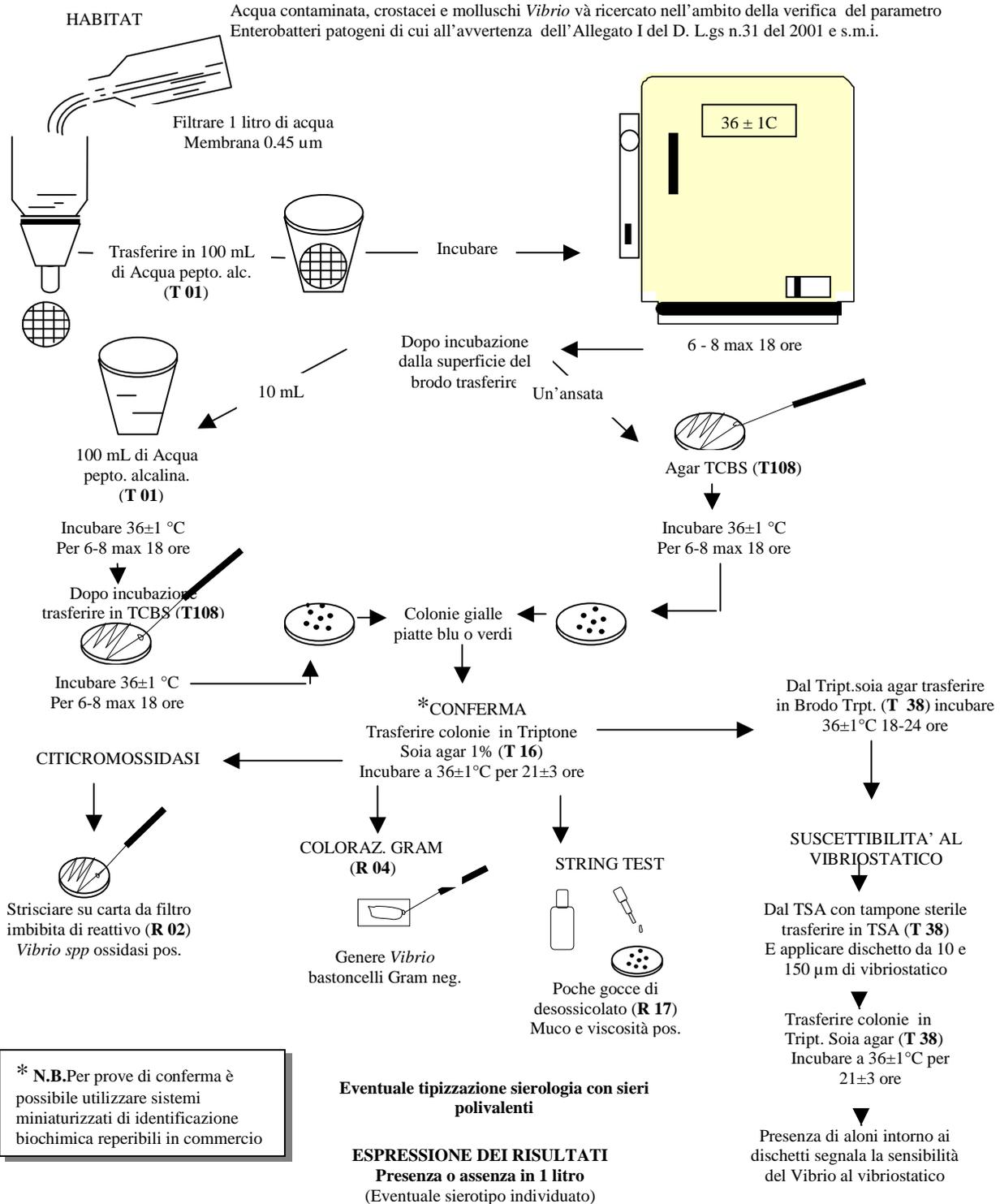
2.2.21 Enterobatteri patogeni: *Vibrio* Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 013A Rev. 00

CARATTERISTICHE

Batteri di forma incurvata Gram -, ossidasi+, asporigini, mobili, aerobi e anaerobi facoltativi. Interessanti la patologia umana sono quelli della specie *Vibrio cholerae* optimum di crescita 37°C pH 6,8 - 9 concentrazione di NaCl 0-3%. . Gluc. +, mannitolo +, saccarosio + inositol-, lattosio -, arabinosio -, caalasi +, lisina e ornitina decarbossilasi+ in genere non emolitico Scarsa resistenza al calore e disinfettanti. Gli appartenenti al genere quali: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *alginolyticus* sono alofili e spesso associati a manifestazioni diarroiche, infezioni, setticemie.

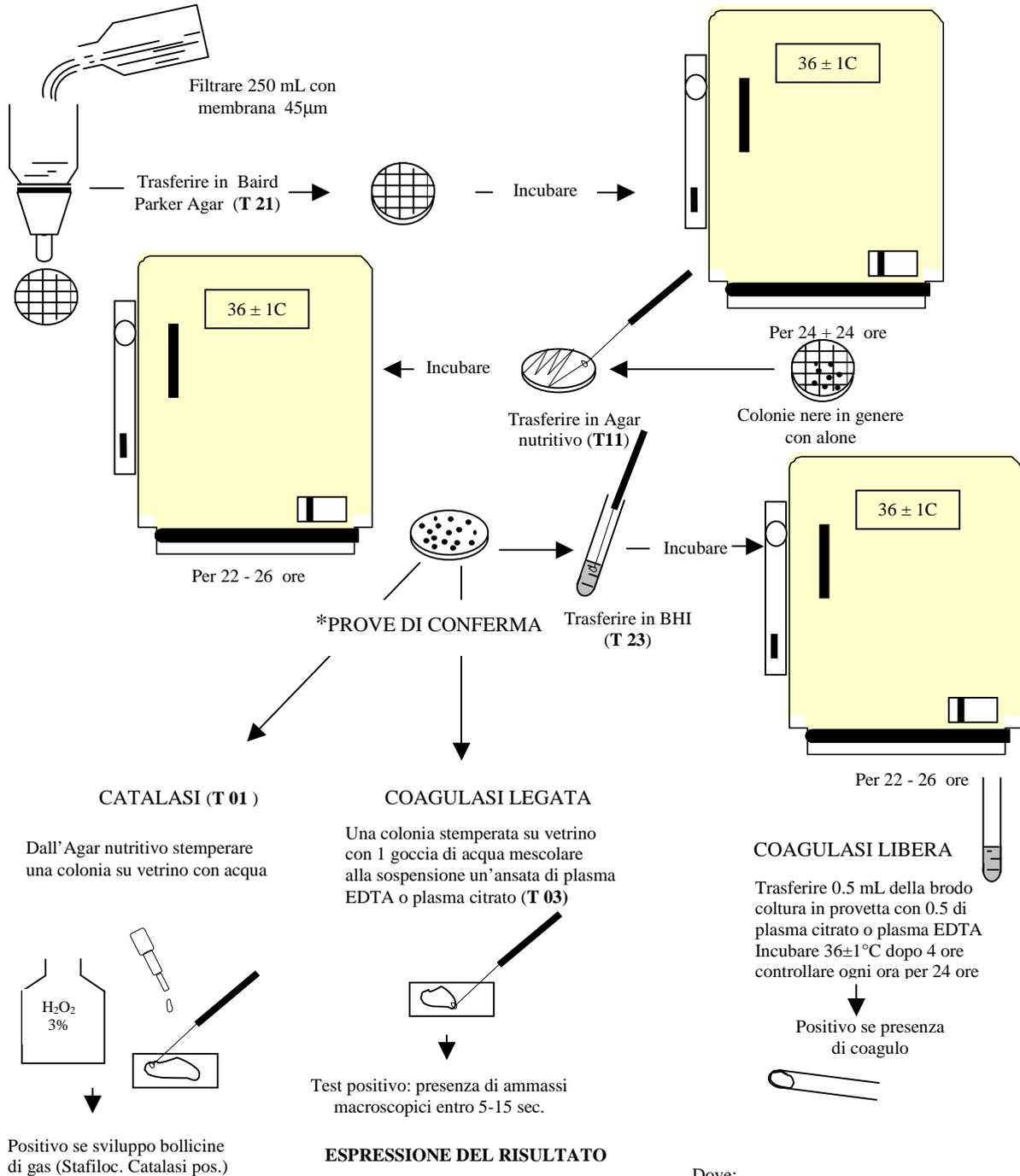
MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il colera è malattia grave, insorge in modo acuto, diarrea profusa acquosa, vomito, disidratazione, acidosi e collasso circolatorio. Incubazione da alcune ore a 5 gg, di solito 2- 3gg.



*** N.B.** Per prove di conferma è possibile utilizzare sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica reperibili in commercio

2.2.22 Determinazione stafilococchi patogeni Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 018A Rev. 00



$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_S \cdot F}{B \cdot V_t}$$

Dove:

C = n. di colonie confermate per 100 o 250 mL

A = n. di colonie confermate

B = n. di colonie da sottoporre a conferma

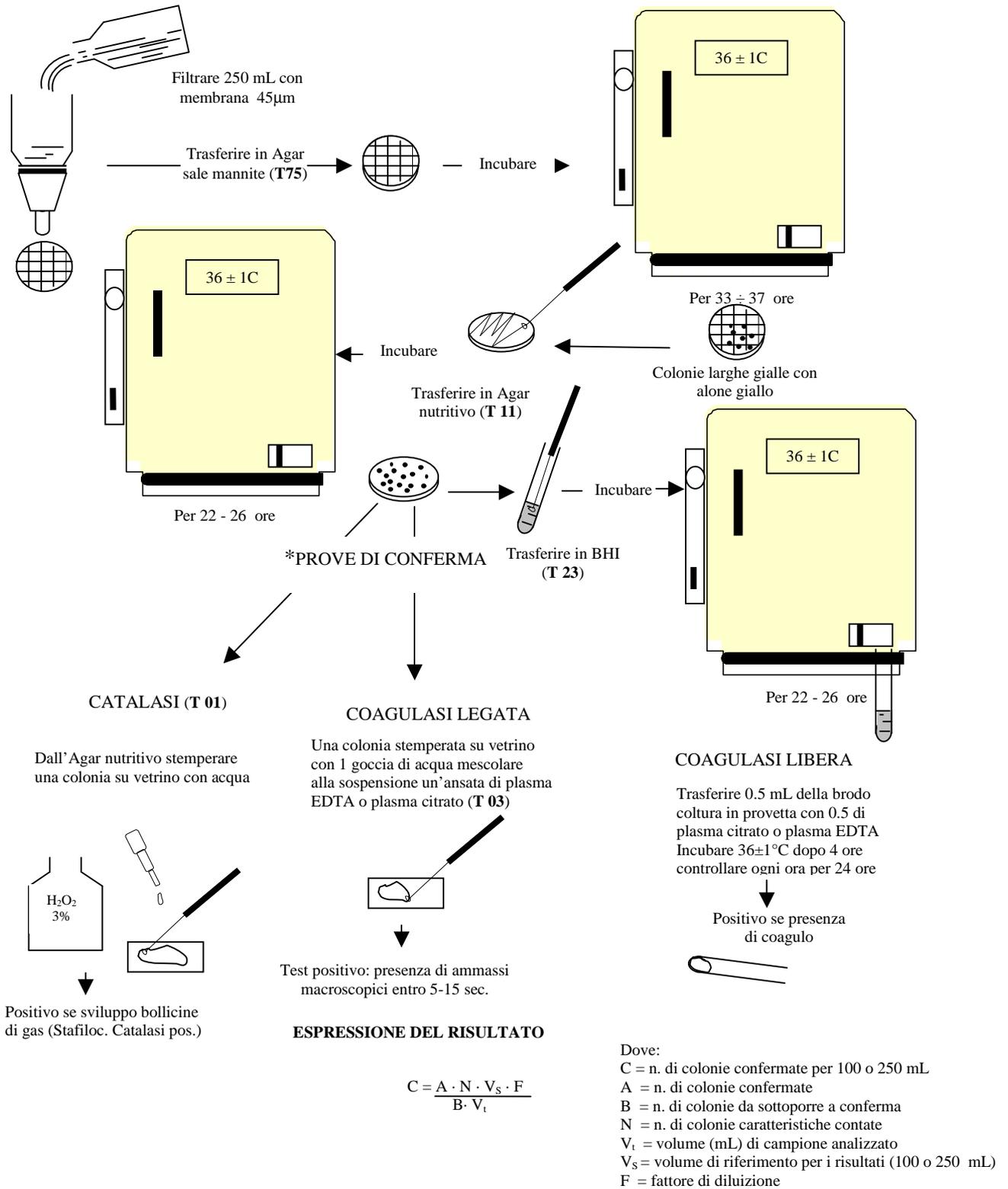
N = n. di colonie caratteristiche contate

V_t = volume (mL) di campione analizzato

V_S = volume di riferimento per i risultati (100 o 250 mL)

F = fattore di diluizione

2.2.23 Determinazione stafilococchi patogeni
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A O18B Rev. 00



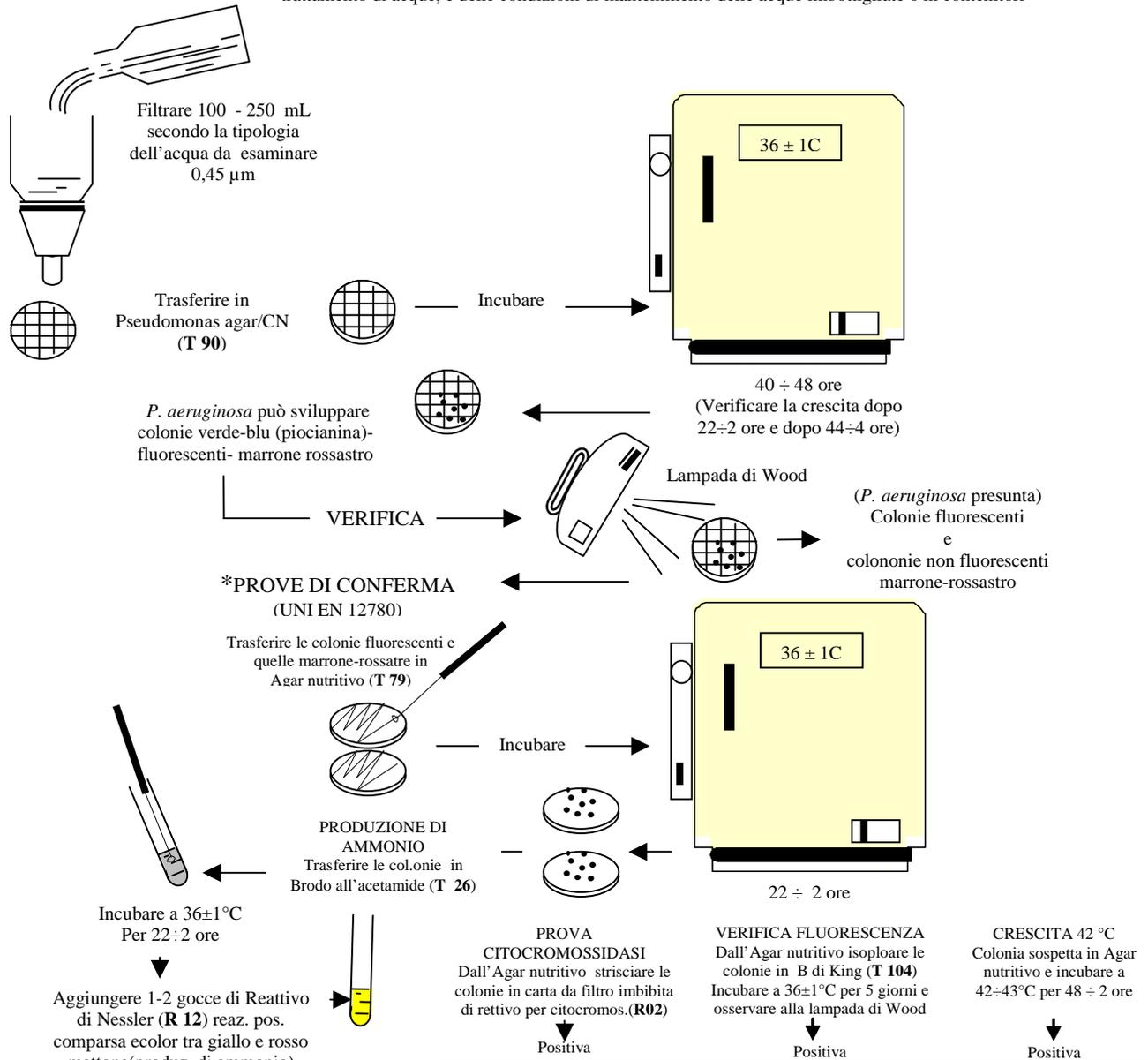
2.2.24 Determinazione di *Pseudomonas aeruginosa*

Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 003A Rev.00 Riferimento UNI EN ISO 12780:2002

CARATTERISTICHE La *Pseudomonas aeruginosa* ha forma di bastoncino dritto o legg. Ricurvo, mobile per flagelli polari, Gram – aerobio, citocromossidasi e cataasi +. Cresce a 42°C ma non a 4°C, resistente ai coloranti trifenilmetanici è l'unico che produce piocianina (verde-blu) produce inoltre piorubina (rossastro-marrone) floresceina (giallo-verde). Ha elevata adattabilità si ritrova in acque superf., reflue, suolo, vegetazione, ambienti umidi, in acque clorate se cloro < 1mg/l

MANIFESTAZIONI CLINICHE Multi resistente agli antibiotici, provoca infezioni alle vie urinarie, ulcere corneali e cheratite, setticemie, gastroenteriti nei neonati, broncopolmoniti e meningiti.

HABITAT Acque contaminate, vegetali. E' un'importante indicatore per l'accertamento dell'efficacia del trattamento di acque, e delle condizioni di mantenimento delle acque imbottigliate o in contenitori



ESPRESSIONE DEL RISULTATO

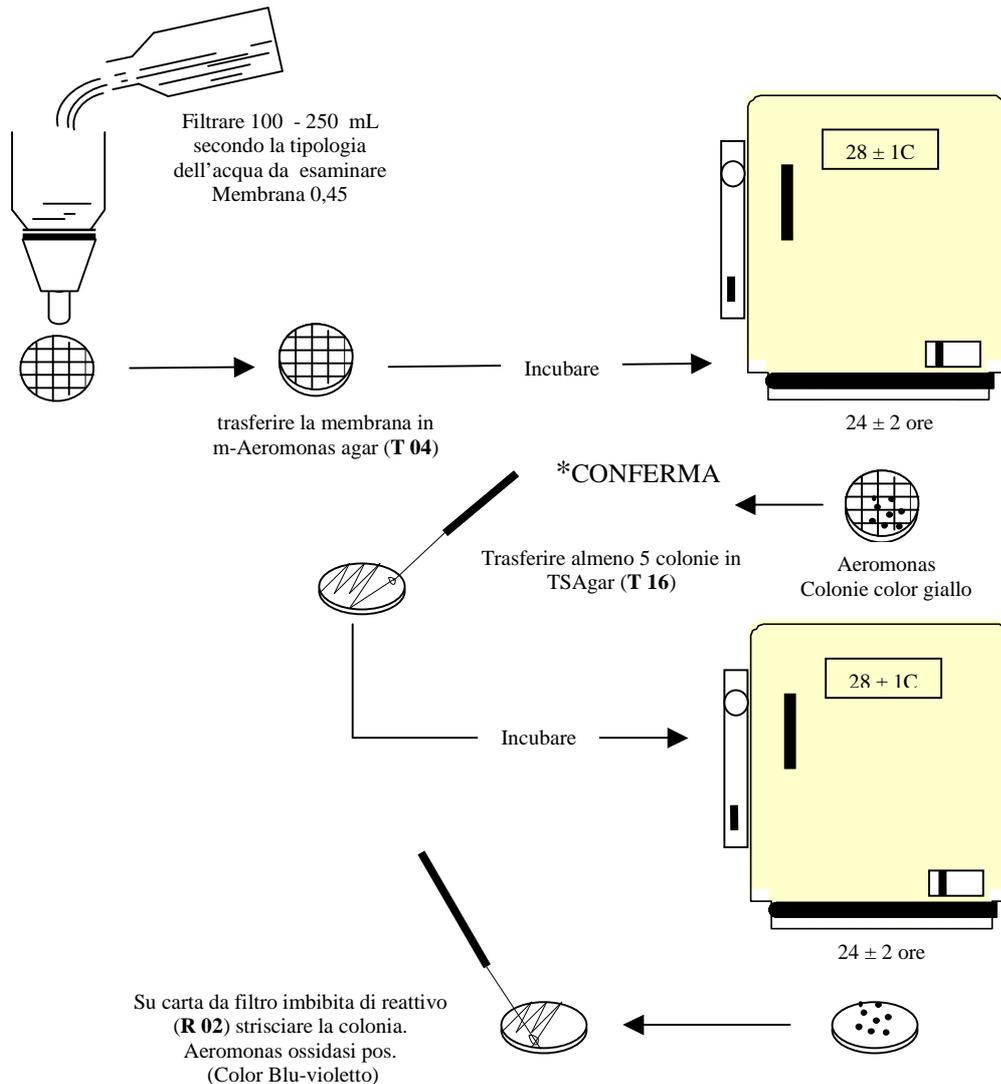
$$C = [P + F(cF / nF) + R(cR / nR)] * \frac{V_t * F}{V_s}$$

* N.B. per le prove di conferma possono essere utilizzati sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio

C = colonie confermate in 100 mL o 250 mL
 P = n. colonie verde-blu
 F = n. colonie fluorescenti
 R = n. colonie marrone-rossastro
 cF = n. colonie fluorescenti e positive per la produz. di ammonio
 nF = n. colonie fluorescenti e saggiate per la produz. di ammonio
 cR = n. colonie marrone-rossastro positive per la produz. di ammonio, la citocromossidasi, la fluorescenza su terreno di B di King
 nR = n. colonie marrone-rossastro saggiate per la produz. di ammonio, la citocromossidasi, la fluorescenza su terreno di B di King
 V_t = Volume del campione analizzato (in mL)
 V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 o 250 mL)
 F = fattore di diluizione

2.2.25 Batteri opportunisti patogeni: *Aeromonas* spp Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 014A Rev.00

CARATTERISTICHE	Famiglia Aeromonadaceae (messa in discussione l'appart. alla Vibrionaceae). Due gruppi Per l'uomo interessa 2° gruppo comprendente <i>A. Hydrofila</i> , <i>A. Caviae</i> , <i>A. Sobria</i> . Anaerobi facolt. Gram - Ossidasi + Catalasi + Indolo + Saccarosio + Mannitolo + Riducono i nitrati a nitriti. Crescono temp. 28°C, si moltiplicano a temp. 4-42°C. Non cresce a temp. inf. 4°C in genere sono sale tolleranti (4% NaCl) ma è influenzato dalla temperatura
MANIFESTAZIONI CLINICHE	La forma più comune è la "colera simile" con feci acquose, febbre modesta e nei bambini sotto i 2 anni vomito. Vi è una forma "dissenteria-simile" con sangue e muco nelle feci. La diarrea in genere è in forma lieve. L'A. spp è stato implicato in setticemie, endocarditi, infezioni oculari, artrite, ostiomielite, meningiti soprattutto in sogg. Immono-compromessi
HABITAT	Presente in gran parte dei vegetali. Nell'acqua dolce e salata (il cloro riduce l'A. in relazione alla temp. e al cloro residuo). Trovata in carni bovine, suine, ovine e avicole. Prodotti della pesca sopra tutto molluschi. Trovata in gelati e creme pronte, piatti freddi, maionese



ESPRESSIONE DEL RISULTATO

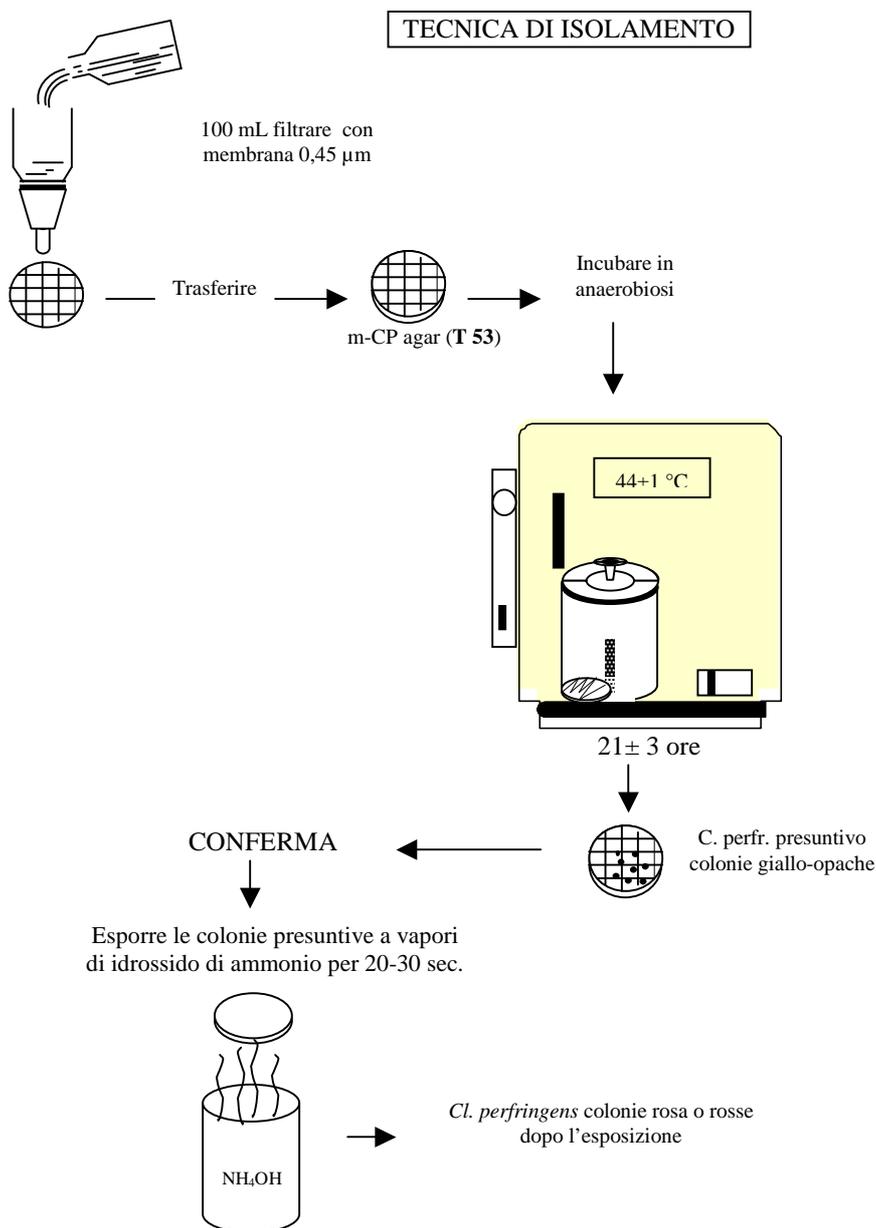
$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_S \cdot F}{B \cdot V_t}$$

Dove:
 C = n. di colonie confermate per 100 mL
 A = n. di colonie confermate
 B = n. di colonie da sottoporre a conferma
 N = n. di colonie caratteristiche contate
 V_T = volume (mL) di campione analizzato
 V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
 F = fattore di diluizione

***N.B.** in alternativa la prova di conferma può essere effettuata con sistemi miniaturizzati disponibili in commercio. La ricerca di questo microrganismo non è prevista dalla normativa italiana. Tuttavia la sua presenza è stata segnalata più volte nelle acque destinate al consumo umano.

2.2.26 Determinazione di *Clostridium perfringens*
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS Met. 005 A Rev.00
(Solo su acque provenienti o contaminate da acque superficiali)

CARATTERISTICHE	Tra i Cl. capaci di ridurre il solfito (<i>C. Perfringens</i> , <i>C. Bifermentans</i> ; <i>C. Absonum</i>) il più pericoloso per la salute pubb. è il <i>C. Perfringens</i> , grosso bacillo sporigeno tossigeno diviso in 5 tipi (A...E), produttore di 4 tossine (alfa, beta, epsilon, iota). Proteolitico gassogeno, moderat. alofilo, sviluppa a 20-50°C pH 5.5-8.0 Aw 0.945-0.930. Gluc.+ Latt.+ Solicina- emolisina + mobilità- catalasi -. Le spore sopravvivono a cotture inf. a 100°C
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Incubazione 8-22 ore. Diarrea, dolori add., talvolta vomito, non febbre. Gravi setticemie Gangrena gassosa
HABITAT	Larga diffusione: carni, pollame, semiconservati, selvaggina.

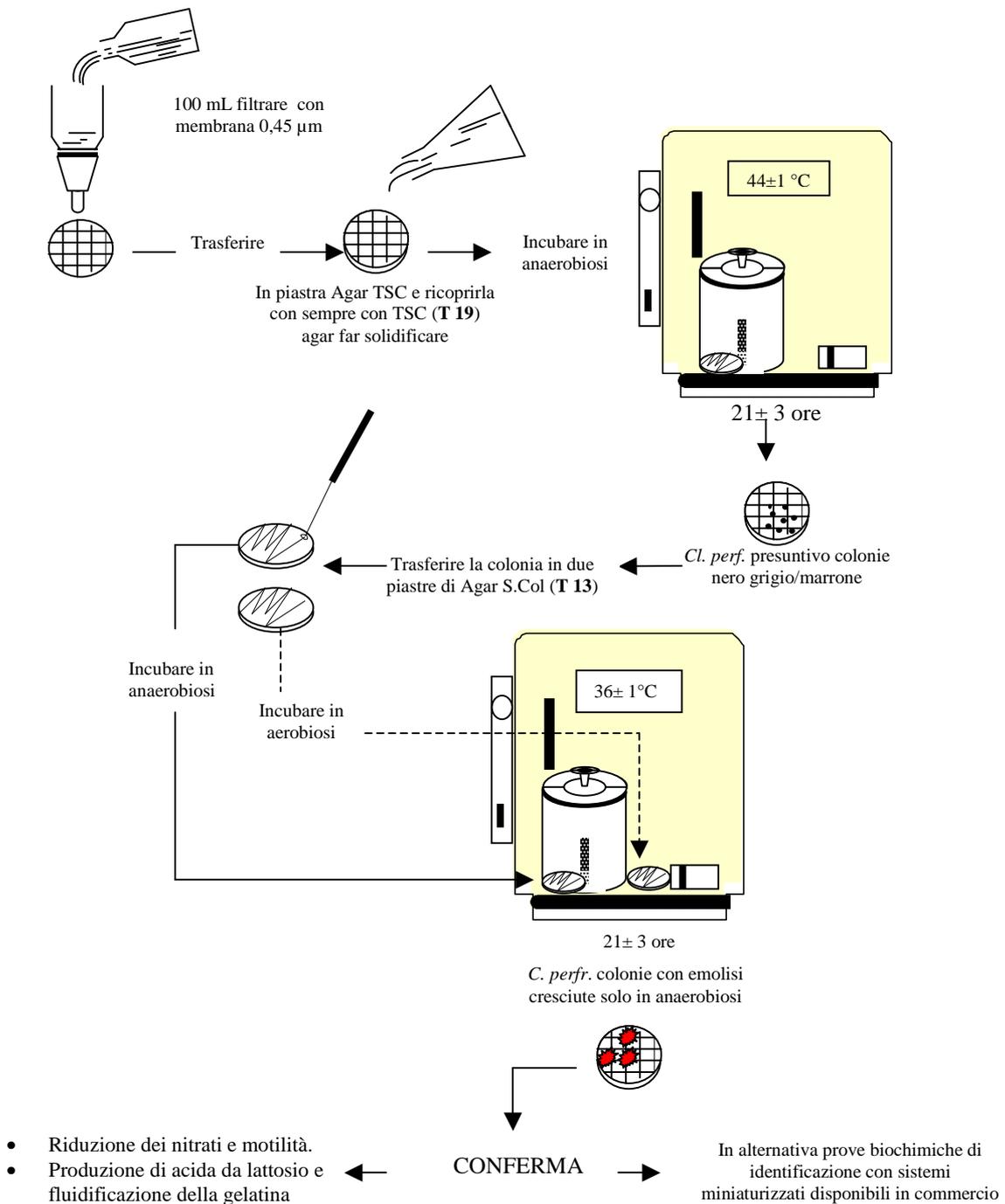


ESPRESSIONE DEL RISULTATO

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t}$$

Dove:
 C = n. di colonie confermate per 100 mL
 A = n. di colonie confermate
 B = n. di colonie da sottoporre a conferma
 N = n. di colonie caratteristiche contate
 V_T = volume (mL) di campione analizzato
 V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)
 F = fattore di diluizione

2.2.27 Determinazione di *Clostridium perfringens*
Rapporti ISTISAN 07/5 ISS Met. 005 B Rev.00
(Solo su acque provenienti o contaminate da acque superficiali)



ESPRESIONE DEL RISULTATO

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_S \cdot F}{B \cdot V_t}$$

Dove:

C = n. di colonie confermate per 100 mL

A = n. di colonie confermate

B = n. di colonie da sottoporre a conferma

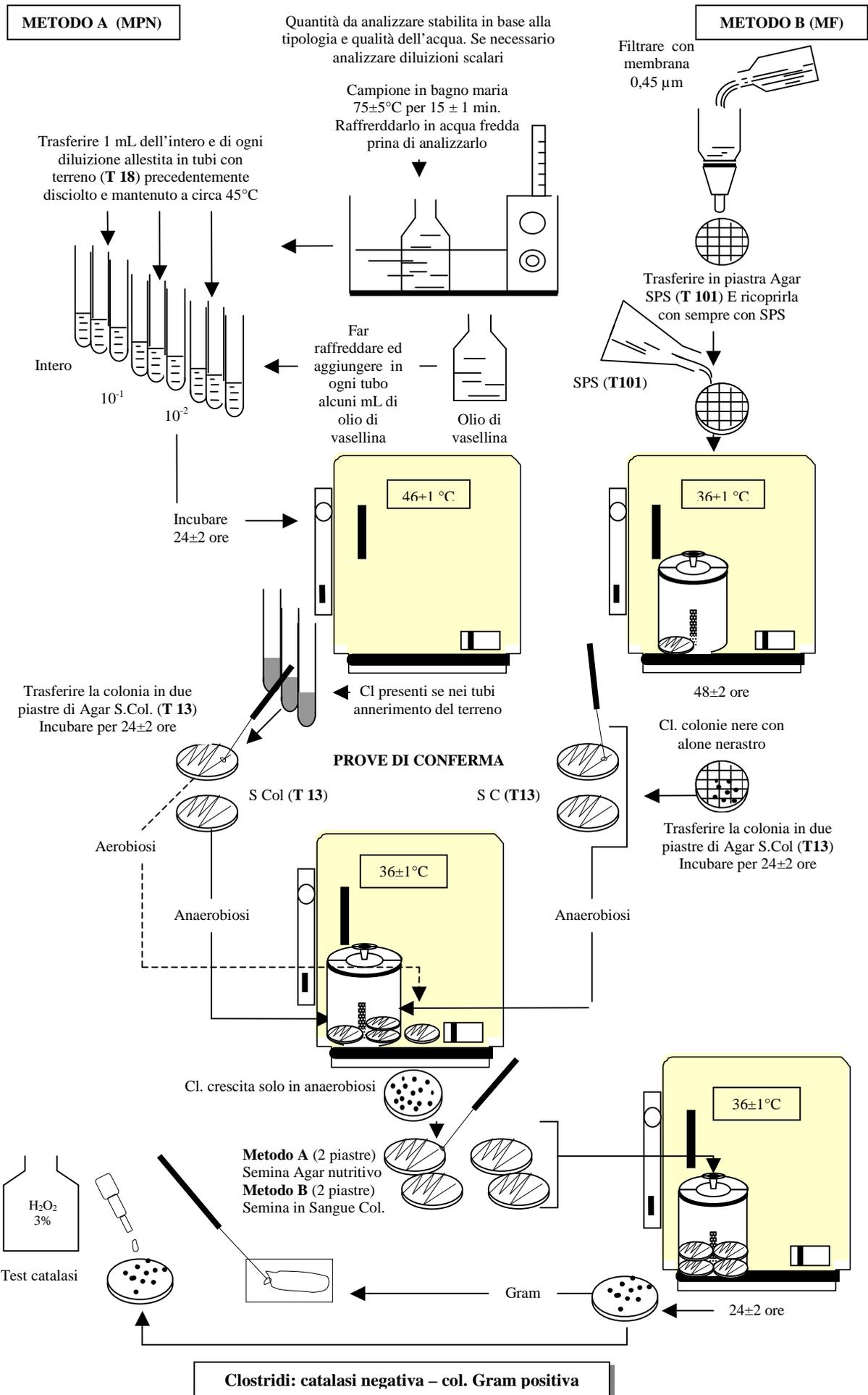
N = n. di colonie caratteristiche contate

V_T = volume (mL) di campione analizzato

V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)

F = fattore di diluizione

**2.2.28 Spore di clostridi solfito riduttori APAT CNR-IRSA 7060 Manuali e linee guida 29-2003
(Acque superficiali, di fiume, di lago, acque reflue anche sottoposte a trattamento)**



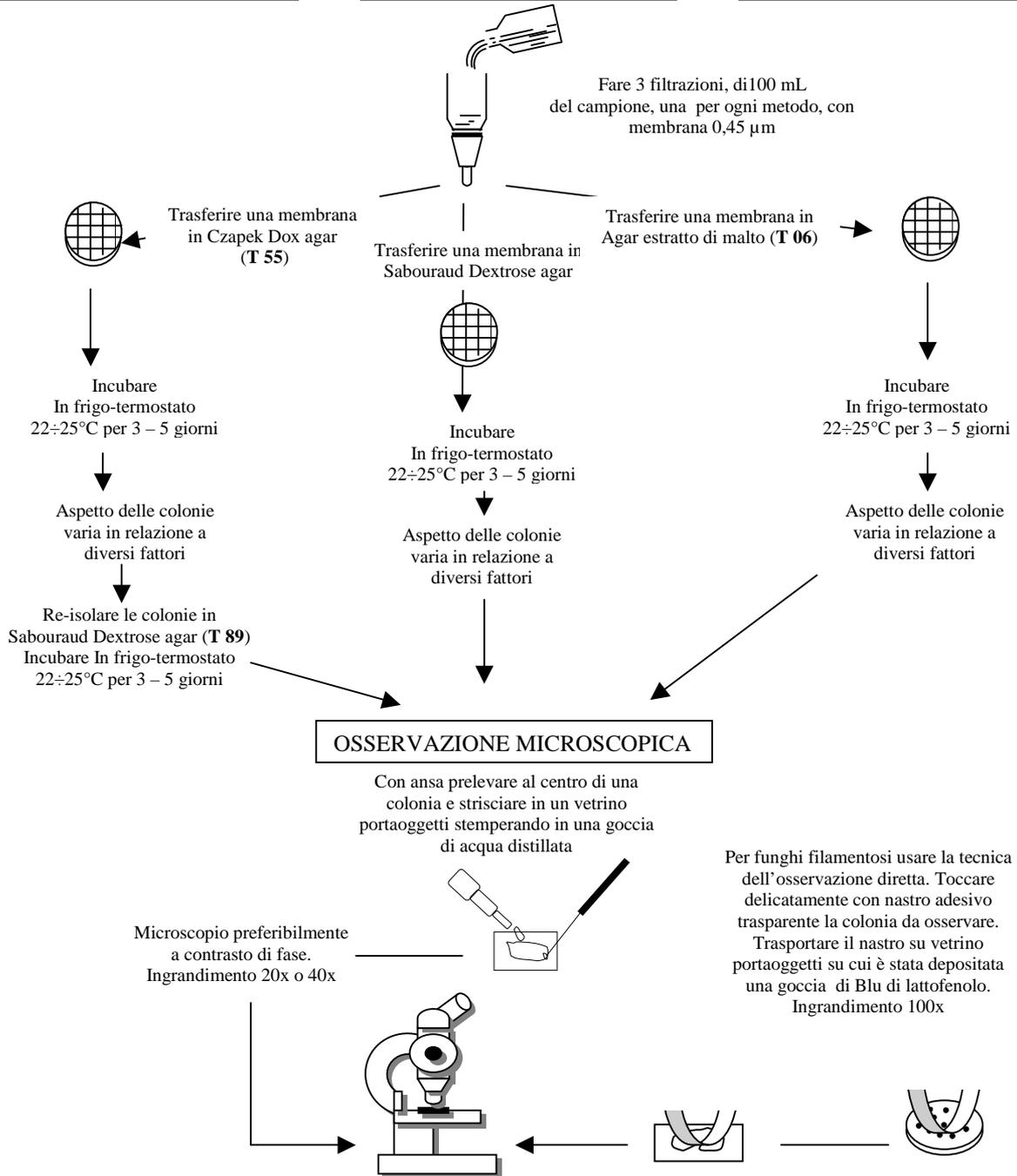
2.2.29 Determinazione dei funghi Rapporti ISTISAN 07/5

(Acque destinate al consumo umano, acque di piscina, acque trattate e acque e soluzioni di dialisi)

METODO ISS A 016A Rev. 00

METODO ISS A 016B Rev. 00

METODO ISS A 016C Rev. 00



ESPRESSIONE DEI RUISULTATI

$$C = \frac{N * V_s * F}{V_t}$$

Dove:

C = n. di colonie per 100 mL

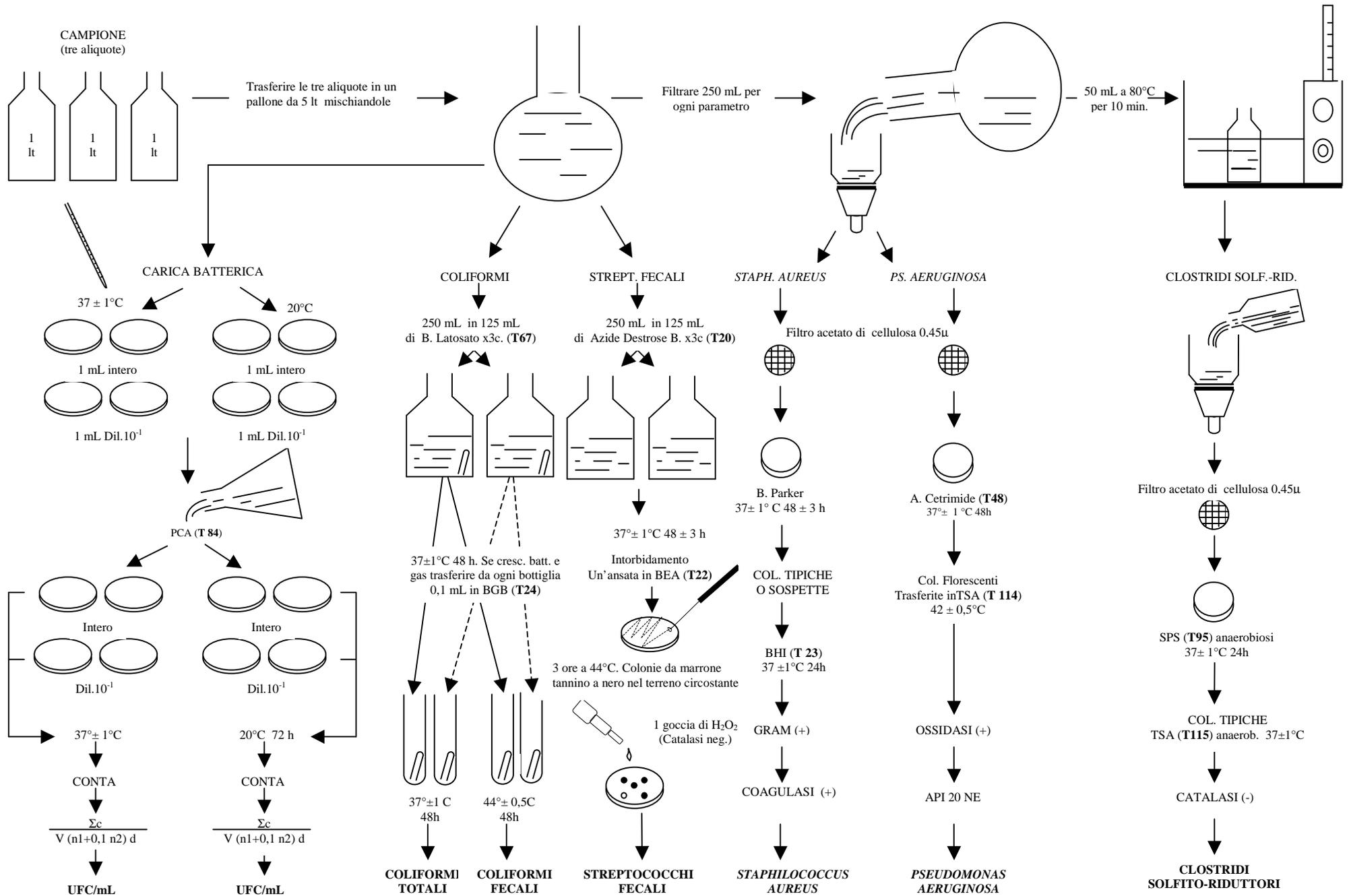
N = n. di colonie caratteristiche contate sulla membrana

V_T = volume di campione analizzato

V_S = volume di riferimento per i risultati (100 mL)

F = fattore di diluizione

2.2.30 Acque minerali – D.M. 13-01-93 G.U. n. 14-01-93 Modalità operative



2.2.31 Schema riassuntivo dei terreni culturali per ricerche microbiologiche su acque

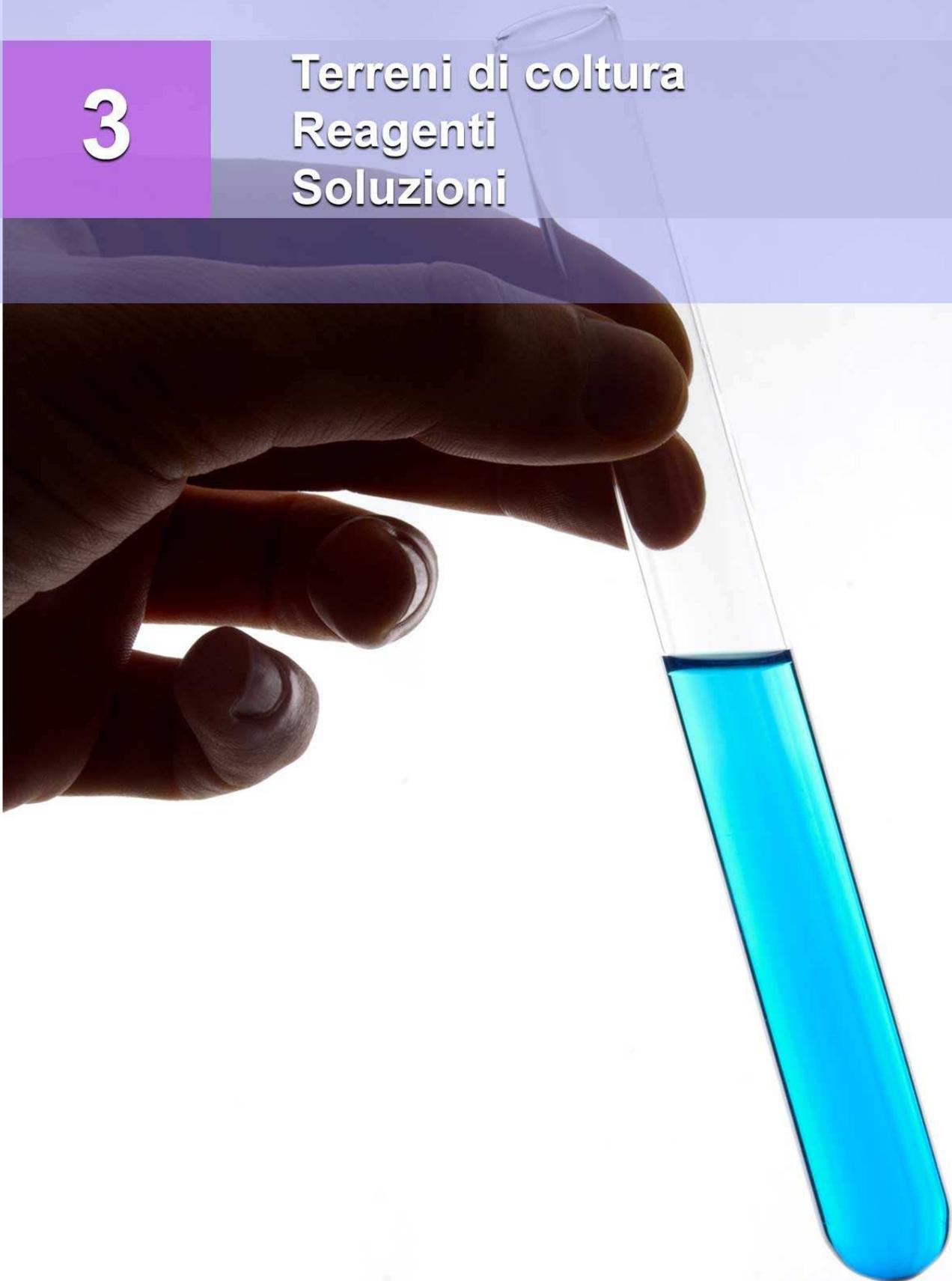
Microrganismi	Metodo	Terreni arricchimento e arricchimento selettivo	Terreni selettivi	Terreni differenziali e reattivi
<i>Legionella pneumofila</i>	Docum. 4/4/2000 GU n103 5/5/2000	Legionella selective medium (GVPC) ASColumbia	Legionella BCYE α growth supplement	Colorazione di Gram Test agglutinazione
Colonie a 22 e 37°C	UNI EN ISO 6222:2001	Agar estratto di lievito		
Coliformi a 37°C	Rapporti ISTISAN 07/5	Defined substrate technology (Colilert)		
<i>Escherichia coli</i>	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 001A	Defined substrate technology (Colilert)		
Coliformi totali	APAT CNR-IRSA7010 Man. 29/2003	Brodo lauril triptosio Lactose broth	Billian green bile (BGLB)	
Coliformi a 37°C	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 006B Rev. 00	Agar soia triptone Brodo lattosato al bromocresolo	m-Endo agar LES	Ossidasi
Coliformi fecali	APAT CNR-IRSA7020B Man. 29-2003	Tryptic soy agar	C-EC agar m-FC agar	Ossidasi Prove biochimiche
Coliformi totali	APAT CNR-IRSA7010C Man. 29-2003	Tryptic soy agar	C-Ec agar Chromogenic E coli/coliform medium	Ossidasi Prove biochimiche
<i>Escherichia coli</i> Metodo A Metodo B Metodo C Metodo D Metodo E Metodo F	APAT CNR-IRSA7030		Mug/EC medium Colilert C-EC agar Chromogenic E. coli agar Chromogenic coliform agar Tryptone bile X-glucuronide agar	
<i>Escherichia coli</i> (prova normalizzata)	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 001B Rev0 Rif.UNI EN ISO 9308-1:2002	Tryptic soy agar triptofano Broth	Tergitol-7 agar	Ossidasi Reattivo Kovacs
<i>Escherichia coli</i> (prova rapida)	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 001C Rev. 00 Rif. UNI EN ISO 9308-1:02	Tryptone bile agar (TBA) Tryptone bile agar		Produzione di indolo
Enterococchi	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 002A Rev.00		Slanez e Bartley Bile esculina azide agar (BEA)	
Streptococchi fecali Enterococchi	Rif. UNI EN ISO 7893-2:03 APAT CNR-IRSA 7040 Man. 29-2003	Tryptic soy agar	Slanez e Bartley Bile esculina azide agar (BEA)	Catalasi Prove biochimiche
Salmonella spp	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 011A Rev. 00	Rappaport Vassiliadis Acqua peptonata tamponata Tryptic soia agar	Hektoen enteric agar (HEA)	Agar ferro di Kligler Agar al ferro e lisina C-8 esterasi Ossidasi

Microrganismi	Metodo	Terreni arricchimento e arricchimento selettivo	Terreni selettivi	Terreni differenziali e reattivi
Salmonella spp	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 011B Rev. 00	Acqua peptonata tamponata Tryptic soy agar	Rappaport Vassiliadis Chromogenic salmonella agar	Ossidasi Conferma sierologia
Salmonella spp	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 011C Rev. 00	Rappaport Vassiliadis Acqua peptonata tamponata Tryptic soy agar	Rambach agar	Ossidasi Conferma sierologia
Salmonella	APAT CNR- IRSA 7080 Man. 29- 2003	Acqua peptonata tamponata Rappaport Vassiliadis Brodo tetratonato (selenite) Plate count agar (PCA)	Xilolo lisina desossicolato agar (XLD) Rambach Hektoen enteric agar (HEA)	Fermentazione carboidrati Ossidasi Lisina decarbossilasi Agar ferro Kligler Conferma sierologica
Shigella	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 012A Rev.00	GN Haijna Agar nutritivo	Xilolo lisina desossicolato agar (XLD)	C8-esterasi Agar ferro di Kligler Ossidasi Conferma seriologica
Shigella	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 012B Rev.00	GN Haijna Agar nutritivo	Xilolo lisina desossicolato agar (XLD)	C8-esterasi Agar ferro di Kligler Ossidasi Conferma seriologica
Shigella	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 012C Rev.00	GN Haijna Agar nutritivo	Hektoen enteric agar (HEA)	Agar ferro di Kligler C8-esterasi Ossidasi Conferma sierologica
Vibrio spp	Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 013A Rev. 00	Acqua peptonata alcalina Brodo triptone NaCl 1% Tryptic soia agar	TCBS Colera medium	Ossidasi Strin test Colorazione di Gram
Stafilococchi patogeni	Rapporti ISTISAN 07/5 ISSA 018A Rev.00	Agar nutritivo Brain Hert infusion	Baird Parker agar	Catalasi Coagulasi legata e libera
Stafilococchi patogeni	Rapporti ISTISAN 07/5 ISSA 018B Rev.00	Agar nutritivo rain Hert infusion	Mannitolo salt agar (ASM)	Catalasi Coagulasi legata e libera
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UNI EN ISO 16266:2008	Agar nutritivo	Pseudomonas agar/CN	Ossidasi Fluorescenza Brodo All'acetamide Reattivo di Nessler Terreno Base di King
Aeromonas spp	ISSA 014A Rev. 00 Rap. ISTISAN 07-5	Triptone soia agar	m-Aeromonas agar	Ossidasi
<i>Clostridium perfringens</i>	ISSA 005A Rev. 00 Rap. ISTISAN 07-5		Clostridium perfringens (m-CP) medium	Idrossido d'ammonio

Microrganismi	Metodo	Terreni arricchimento e arricchimento selettivo	Terreni selettivi	Terreni differenziali e reattivi
<i>Clostridium perfringens</i>	ISSA 005B Rev. 00 Rap. ISTISAN 07-5	Agar sangue Columbia (ASC)	Agar triptosio solfito cicloserina (TSC)	
Spore Cl. solfito-riduttori	APAT CNR- IRSA 7060 Met. A Man. 29:2003	Agar nutritivo al sangue di coniglio Agar sangue Columbia (ASC) Agar nutritivo	Agar triptone solfito e neomicina	Catalasi Colorazione di Gram
Spore Cl. solfito-riduttori	APAT CNR- IRSA 7060 Met. B Man. 29:2003	Agar nutritivo al sangue di coniglio Agar sangue Columbia (ASC) Agar nutritivo	Agar Solfito polimixina solfadiazina(SPS)	Catalasi Colorazione di Gram
Determinazione funghi	Rapporti ISTISAN 07-5 Met. ISSA 016A Rev.00	Czapk Dox agar	Sabouraud Dextrose agar	Esame microscopico
Determinazione funghi	Rapporti ISTISAN 07-5 Met. ISSA 016B Rev.00		Sabouraud Dextrose agar	Esame microscopico
Determinazione funghi	Rapporti ISTISAN 07/5 Met. ISSA 016B Rev.00	Agar estratto di malto		Esame microscopico

3

**Terreni di coltura
Reagenti
Soluzioni**



3.1 Premessa terreni

La preparazione dei terreni colturali è un compito delicato e importante che richiede attenzione e il rispetto scrupoloso delle indicazioni suggerite dalla ditta fornitrice.

Molti terreni vengono messi in commercio in forma disidratata a formulazione completa, altri occorrono, al momento della preparazione, dell'aggiunta di costituenti quali antibiotici, antifungini, indicatori ecc..

I terreni colturali sono in genere divisi in:

Terreni elettivi	In agar o brodi ricchi di sostanze nutritive che permettono la crescita di tutte le specie batteriche
Terreni selettivi	In agar o brodi che contengono, in opportune concentrazioni, sostanze che facilitano lo sviluppo della specie batterica ricercata, inibendo la crescita della flora batterica associata che potrebbe interferire ed essere di disturbo nell'individuazione dei microrganismi in esame
Terreni differenziali	Tutti quelli che contengono particolari substrati e indicatori che evidenziano le caratteristiche biochimiche del batterio studiato, come, ad esempio, l'utilizzo o meno di alcuni carboidrati, la produzione di decarbossilasi, deaminasi, la decomposizione di proteine ecc..

La preparazione dei terreni in laboratorio richiede l'uso di strumenti e attrezzature la cui scelta deve tener conto delle "...condizioni e le caratteristiche specifiche del lavoro da svolgere..." (D. Lgs 626/94), pertanto ogni strumento, collocato in apposito spazio, avrà di corredo una scheda con tutte le informazioni tecniche, una scheda per la manutenzione ordinaria e straordinaria e una per le tarature.

Ogni terreno avrà anch'esso una scheda in cui verrà registrato la data del suo arrivo, la ditta fornitrice, da data di apertura e le prove a cui è stato sottoposto.

Al momento della preparazione il terreno verrà con precisione pesato, reidratato con opportuna quantità di acqua demineralizzata, sciolto in bagnomaria bollente fino a completa soluzione e infine sterilizzato; verrà inoltre misurato il pH che, qualora non rientrasse nei limiti indicati, dovrà essere aggiustato con soluzioni di NaOH o di HCL 0,1 N. Dopo la preparazione i terreni sono conservati in tubi, in beute o in piastre di Petri, al riparo della luce diretta e refrigerati, forniti di etichetta riportante il nome del terreno, la data di preparazione e di scadenza, il pH, e il nome del preparatore.

Ogni terreno è sottoposto, attraverso l'uso di ceppi batterici certificati, a:

- Controllo della sterilità;
- Controllo della fertilità;
- Controllo della selettività.

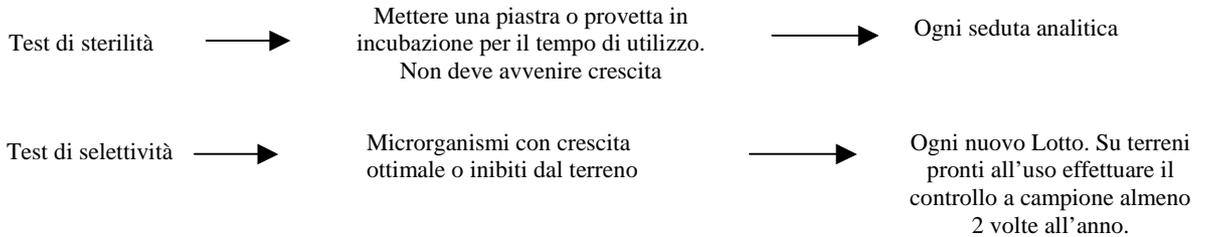
Ogni controllo dovrà essere documentato, registrato in apposita scheda e archiviato, comunque in conformità alle prescrizioni della norma UNI – CEI – EN – ISO/IEC 17025

3.2 Valutazione della produttività e della selettività dei terreni colturali per prove microbiologiche

Terreni preparati in laboratorio

- Compilare una scheda per ogni lotto di terreno con i dati identificativi.
- Identificare con la data di preparazione ogni partita. Compilare la scheda corrispondente al terreno utilizzato (vedi "Premessa terreni")

CONTROLLI SU LOTTI E PARTITE



ESECUZIONE DEL TEST

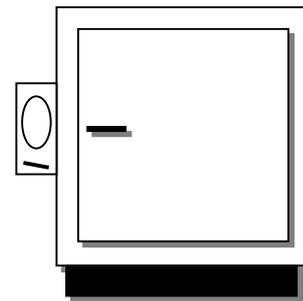


TERRENI SOLIDI

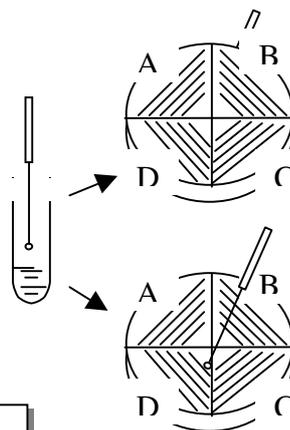
In 5 mL di BHI (T23) un'ansata del microrganismo specifico



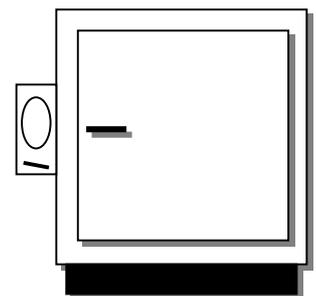
4 h 37°C



Dopo incubazione con ansa da 1µl strisciare con strisce parallele, senza flambare o ricaricare l'ansa, procedendo da A a D. Allestire una piastra con terreno da saggiare ed una di controllo con terreno non selettivo



Incubare a temp. d'utilizzo



Verificare l'ultima zona in cui si verifica la crescita batterica in tutte e due le piastre

Indice di crescita assoluta (AGI)			
A1 = 5	B1 = 10	C1 = 15	D1 = 20
A2 = 25	B2 = 30	C2 = 35	D2 = 40
A3 = 45	B3 = 50	C3 = 55	D3 = 60
A4 = 65	B4 = 70	C4 = 75	D4 = 80
A5 = 85	B5 = 90	C5 = 95	D5 = 100

$$RGI = \frac{AGI(\text{test})}{AGI(\text{contr.})} \times 100$$

FERTILITÀ E SELETTIVITÀ QUALITATIVA

Seminare in piastra il ceppo indicato nella scheda del terreno da testare. Controllare la crescita e morfologia delle colonie e/o l'inibizione A

CRITERI DI ACCETTABILITÀ

- Il test di fertilità valore AGI >80 e l'IRG >90%
- Test di selettività valore AGI <20 e l'RGI <25%

3.3 Terreni di coltura

I terreni (T 999) sono elencati in ordine alfabetico.

Segue elenco dei reagenti e soluzioni (R 999).

I valori del pH dei terreni e diluenti si intendono misurati alla temperatura di circa 25°C.

T 01. ACQUA PEPTONATA ALCALINA

Peptone	20	g
Cloruro di sodio.....	10	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 8.6 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave 15 minuti a 121°C.

Conservare a 2 - 8°C.

T 02. ACQUA PEPTONATA SALINA ALCALINA (APA)

Peptone	20	g
Cloruro di sodio.....	30	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 8.6 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave 15 minuti a 121°C.

Conservare a 2 - 8°C.

T 03. ACQUA PEPTONATA TAMPONATA (APT)

Peptone	10	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Fosfato di sodio monoacido	3.5	g
Fosfato di potassio biacido.....	1.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.2 ± 0.2

Reidratare, sciogliere, distribuire in beute, sterilizzare in autoclave 15 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$.

Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di due settimane

T 04. m-AEROMONAS AGAR

Trptosio	5.0	g
Estratto di lievito	2.0	g
Destrina	11.4	g
Cloruro di sodio.....	3	g
Cloruro di potassio	2	g
Solfato di magnesio	0.1	g

Cloruro ferrico.....	0.06	g
Sodio desossicolato	0.1	g
Blu di bromotimolo	0.08	g
Agar	13	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 8.0 ± 0.2

SOLUZIONE DI AMPICILLINA

Ogni flacone contiene:

Ampicillina.....	5	g
Acqua distillata.....	5	mL

Terreno selettivo completo

m-Aeromonas base.....	100	mL
Soluzione di ampicillina.....	1	mL

Riscaldare a bagnomaria bollente e portare ad ebollizione agitando delicatamente. Autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Raffreddare a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ ed aggiungere sterilmente la soluzione di ampicillina. Mescolare con cura e distribuire in piastre sterili. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di una settimana.

T 05. AGAR ESTRATTO DI LIEVITO

Estratto di lievito.....	3	g
Triptone	6	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Reidratare il terreno in acqua distillata. Portare ad ebollizione agitando spesso. Distribuire circa 15 mL in tubi e sterilizzare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di due settimane

T 06. AGAR ESTRATTO DI MALTO

Estratto di malto	30	g
Agar	1	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 5.4 ± 0.2

Sciogliere gli ingredienti per ebollizione. Autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Distribuire in capsule di Petri. Le operazioni devono essere fatte sotto cappa a flusso laminare. Conservare per non più di due settimane a $5 \pm 3^\circ\text{C}$

T 07. AGAR DI KLIGLER (KIA)

Estratto di carne.....	3	g
Estratto di lievito.....	3	g
Peptone.....	20	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Lattosio.....	10	g
Glucosio.....	1	g
Ferro citrato.....	0.3	g
Tiosolfato di sodio.....	0.3	g
Agar.....	12	g
Rosso fenolo.....	50	mg
Acqua distillata.....	1000	

Reidrattare, sciogliere per ebollizione agitandolo frequentemente. Distribuire in tubi sterilizzare a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Solidificare a becco di clarino, conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane.

T 08. AGAR FERRO E LISINA

Caitone.....	5	g
Estratto di lievito.....	3	g
Destrosio.....	1	g
L-lisina.....	10	g
Ferro ammonio citrato.....	0.5	g
Agar.....	14.5	g
Tiosolfato di sodio.....	40	mg
Porpora di bromocresolo.....	20	mg
Acqua istillata.....	1000	mL

pH 6.2 ± 0.2

Reidrattare, sciogliere per ebollizione agitandolo frequentemente. Distribuire in tubi sterilizzare a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Solidificare a becco di clarino, conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane.

T 09. AGAR GELATINA-FOSFATO (GPSA)

Gelatina.....	10	g
Cloruro di sodio.....	10	g
Fosfato di potassio monoacido.....	5	g
Agar.....	12-18	g
Acqua istillata.....	1000	mL

pH 7.2 ± 0.2

T 10. AGAR GELISATO

AGAR N.1 (BATTERIOLOGICO)
GELATONE

Terreno completo

Agar N.1	15	g
Gelatone	5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Sciogliere il terreno a bagnomaria e autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 11. AGAR NUTRITIVO II

Estratto di carne.....	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 6.8 ± 0.2

Reidratare, autoclavare 15 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$. Conservare $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di due settimane

T 12. AGAR NUTRITIVO SALINO

Estratto di carne.....	3	g
Peptone	5	g
Cloruro di sodio.....	30	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 8.5 ± 0.2

Autoclavare 15 minuti a 121°C

T 13. AGAR SANGUE COLUMBIA

Peptone	23	g
Amido	1	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Agar	10-15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

SANGUE DEFIBRINATO DI MONTONE

Terreno completo

Terreno base	950	mL
Sangue defibrinato di montone	50	mL

Conservare a 4-8°C.

T 14. AGAR SANGUE DI MONTONE

Terreno base		
Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

PREPARAZIONE DELLE EMAZIE DI MONTONE

Centrifugare il sangue defibrinato di montone a 900 x g per 30 min. Rimuovere asetticamente il surnatante e risospendere il sedimento in soluzione fisiologica sterile fino a riportarlo al volume iniziale

Terreno completo

Terreno base	950	mL
Emazia di montone	50	mL

T 15. AGAR SANGUE NUTRITIVO CON SUPPLEMENTI (NBG)

Estratto di carne.....	10	g
Peptone	10	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.4 ± 0.2

SUPPLEMENTO

Sangue lisato di cavallo sterile

SUPPLEMENTO FBT

Solfato di ferro	2.5	g
Piruvato di sodio.....	2.5	g
Metabisolfito di sodio	2.5	g
Acqua distillata.....	10	mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base	950	mL
Sangue lisato di cavallo sterile	50	mL
Supplemento FBT.....	1	mL

Aggiungere il sangue lisato di cavallo sterilizzato separatamente al terreno base raffreddato a 45°C circa, e quindi il supplemento FBT e miscelare.

T 16. AGAR SOIA TRIPTONE

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Dopo aver sciolta la polvere sterilizzare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Distribuire e conservare a $+4^\circ\text{C}$ non più di due settimane.

pH 7.3 ± 0.2

T 17. AGAR SOIA TRIPTONE ESTRATTO DI LIEVITO (TSYEA)

Triptone	16	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Estratto di lievito	6	g
Agar	20	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

T 18. AGAR TRIPTONE SOLFITO E NEOMICINA

Peptone o triptone.....	15	g
Solfito di sodio	1	g
Solfato di neomicina.....	0.02	g
Solfato di polimixina.....	0.05	g
Estratto di lievito	10	g
Citrato ferrico	0.5	g
Agar	13.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.0 ± 0.2

Reidratare in acqua distillata per ebollizione. Distribuire in tubi, autoclavare a $118 \pm 3^\circ\text{C}$ per $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservare a $+4^\circ\text{C}$ per non più di un mese.

T 19. AGAR TRIPTOSIO SOLFITO CICLOSERINA

Triptosio	15	g
Soia peptone	5	g
Estratto di lievito	5	g
Sodio metasolfito.....	1	g
Ferro ammonio citrato.....	1	g
Agar	12	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Preparare il terreno al momento dell'uso. Sciogliere in un litro di acqua distillata sterilizzare $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Raffreddare e aggiungere la soluzione di D-cicloserina

SOLUZIONE DI D-CICLOSERTINA

D-cicloserina	4	g
Acqua distillata.....	100	mL

Sciogliere in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione. Conservare a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ per 15 per non più di un mese.

Terreno completo

Terreno base	1000	mL
Soluzione di cicloserina	10	mL

pH 7.6 ± 0.2

Sciogliere il terreno di base aggiungere cicloserina 10 ml per litro. Miscelare e distribuire in piastre. E' opportuno preparare il terreno al momento dell'uso. Conservare a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ preferibilmente in condizioni anaerobie per non più di sette giorni

T 20. AZIDE DEXTROSE BROTH (ROTHE)

Peptone	20.0	g
Destrosio.....	5.0	g
Sodio cloruro	5.0	g
Potassio fosfato monoacido.....	2.7	g
Potassio fosfato biacido.....	2.7	g
Sodio azide	0.2	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 6.8 ± 0.2

Sospendere 35.6 g in 1000 mL di acqua distillata e riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Distribuire nei contenitori finali e autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 21. BAIRD-PARKER AGAR BASE

Tryptone	10.0	g/L
Lab-Lemco(estratto di carne)	5.0	g/L
Estratto di lievito	1.0	g/L
Sodio piruvato	10.0	g/L
Glicina	12.0	g/L
Litio cloruro.....	5.0	g/L
Agar	20.0	g/L

pH finale 6.8 ± 0.2

EGG YOLK TELLURITE EMULSION

Terreno completo :

Baird-Parker agar base	63	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Portare delicatamente ad ebollizione sino a completa soluzione del terreno. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C. Aggiungere asetticamente 50 mL di Egg Yolk Tellurite Emulsion. Mescolare con cura e versare in piastre sterili.

Conservare il terreno a 2-8°C.

T 22. BILE ESCULIN AZIDE AGAR (BEA)

Yeast extract	5	g
Propteose peptone N.3.....	3	g
Tryptone	17	g
Oxgall	10	g
Esculin	1	g
Ferric ammonium citrate	0.5	g
Sodium chloride	5	g
Sodium azide	0.15	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.1 ± 0.2

Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C e distribuire in piastre sterili

T 23. BRAIN HEART INFUSION (BROTH)

Infuso di cervello di vitello (solidi).....	12.5	g
Infuso di cuore di bue (solidi)	5.0	g
Peptone proteosi	10.0	g
Destrosio.....	2.0	g
Sodio cloruro	5.0	g
Sodio fosfato monoacido.....	2.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.4 ± 0.2

Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Il terreno va conservato al buio e a temperatura inferiore a 20°C.

T 24. BRILLIANT GREEN LACTOSE BILE 2% (BGLB)

Peptone	10	g
Oxgall	20	g
Lactose	10	g
Brilliant Geen	0.0133	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 25. BRODO AL TIOGLICOLLATO

Digerito pancreatico di caseina	15	g
L-cistina.....	0.5	g
D-glucosio	5	g
Estratto di lievito	5	g
Cloruro di sodio.....	2.5	g
Tioglicollato di sodio (mercaptoacetato)	0.5	g
Agar	0.5-0.8	g
Resazurina	0.001	g
Acqua distillata.....	1000	g

pH 7.1 ± 0.2

T 26. BRODO ALL'ACETAMIDE – Soluzione A

Potassio di idrogenofosfato	1	g
Magnesio solfato anidro	0.2	g
Acetamide.....	2	g
Sodio cloruro	0.2	g
Acqua distillata.....	900	mL

pH 7.0 ± 0.5

Sciogliere in acqua distillata. Prodotto cancerogeno ed effetti mutageni, particolari precauzioni nel suo utilizzo. Uso di cappa aspirante e indumenti protettivi

Soluzione B

Sodio molibdato	0.5	g
Ferrosolfato	0.05	g
Acqua distillata.....	100	mL

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata.

Terreno completo

Soluzione A	900	mL
Soluzione B	1	mL
Acqua distillata		

Aggiungere a 900 mL di soluzione A 1 mL di soluzione B e portare a volume di 1 litro con acqua distillata mescolando. Distribuire in tubi 5 mL, autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ al riparo della luce e per non più di tre mesi.

T 27. BRODO DI ARRICCHIMENTO SELETTIVO (EB)

TERRENO BASE

Triptone	17	g
Soitone (idrolizzato papainico di farina di soia)	3	g
Glucosio	2.5	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Fosfato di potassico (K_2HPO_4).....	2.5	g
Estratto di lievito	6	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

SUPPLEMENTO 1

Soluzione A.

Acriflavina HCl	50	mg
Acqua distillata.....	10	mL

Soluzione B

Acido nalidixico (sale sodico).....	50	mL
Acqua distillata.....	10	mL

Ciogliere l'acriflavina HCl e l'acido nalidixico in acqua. Sterilizzare ciascuna soluzione separatamente per filtrazione

SUPPLEMENTO 2

Cicloeximide	100	mg
Etanolo	4	mL
Acqua distillata.....	6	mL

Sciogliere la cicloexamide nella miscela etanolo-acqua

Terreno completo

Terreno base	225	mL
Supplemento 1 soluzione A.....	0.45	mL
Supplemento 1 soluzione B.....	1.8	mL
Supplemento 2.....	1.15	mL

T 28. BRODO DI ARRICCHIMENTO SELETTIVO TAMPONATO (BEB)

Brodo tritone soia.....	30	g
Estratto di lievito.....	6	g
Potassio fosfato biacido.....	1.35	g
Potassio fosfato monoacido.....	9.6	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

T 29. BRODO GELATINA FOSFATO (GPSB)

Gelatina	10	g
Cloruro di sodio.....	10	g
Fosfato di potassio (di basico).....	5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.2 ± 0.2

T 30. BRODO GN HAJNA

Triptosio	20	g
Glucosio	1	g
D-Mannitolo	2	g
Sodio citrato	5	g
Sodio desossicolato	0.5	g
Fosfato bipotassio.....	4	g
Fosfato monopotassio.....	1.5	g
Sodio cloruro	5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.0 ± 0.2

Reidratare, riscaldare agitando spesso, distribuire in beute, sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a 5 ± 3 per non più di un mese.

T 31. BRODO IRGASAN TICARCILLINA (ITC)

Triptone	10	g
Estratto di lievito.....	1	g
Cloruro di magnesio esaidrato ($\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	60	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Soluzione acquosa di verde malachite al 2%	5	mL

Acqua distillata..... 1000 mL

pH 6.9 ± 0.2

SOLUZIONE DI TICARCILLINA (1mg/mL)

Ticarcillina 10 mL

Acqua distillata..... 10 mL

Sterilizzare per filtrazione

SOLUZIONE ALCOLICA DI IRGASAN

Irgasan 10 mg

Etanolo 95% 10 mg

Preparare la soluzione al momento dell'uso oppure conservarla a -20°C per non più di quattro settimane

SOLUZIONE DI CLORATO DI POTASSIO (100 mg/mL)

Clorato di potassio..... 10 g

Acqua distillata..... 100 mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base 988 mL

Soluzione di Ticarcillina 1 mL

Soluzione di Irgasan 1 mL

Soluzione di clorato di potassio 10 mL

T 32. BRODO LATTOSATO AL BROMOCRESOLO

Peptone 5 g

Lattosio..... 5 g

Estratto di carne..... 2 g

Porpora di bromocresolo 0.025 g

Acqua distillata..... 1000 mL

pH 7.4 ± 0.2

Sciogliere il terreno distribuire in tubi e sterilizzare a $115 \pm 3^{\circ}\text{C}$ per 20 minuti. Conservare a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane

T 33. BRODO LAURILTRIPTOSIO

Triptosio 20 g

Lattosio..... 5 g

Di potassio idrogeno fosfato 2.75 g

Potassio di idrogeno fosfato 2.75 g

Sodio cloruro 5 g

Sodio lauril solfato	0.1
Acqua distillata.....	1000 mL

pH 6.8 ± 0.2

Il terreno può essere usato in alternativa al Brodo lattosato. Sciogliere il terreno e distribuirlo in tubi con la campanella di Durham. Sterilizzare, conservare per non più di due settimane.

T 34. BRODO PEPTONE SORBITOLO SALI BILIARI (PSB)

Peptone	5	g
Sorbitolo.....	10	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Fosfato monoacido di sodio (Na ₂ HPO ₄).....	8.23	g
Fosfato biacido di sodio monidr. (Na H ₂ PO ₄ *H ₂ O).....	1.2	g
Sali biliari.....	1.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.6 ± 0.2

T 35. BRODO PER LA UTILIZZAZIONE DEI CARBOIDRATI

TERRENO BASE

Proteose peptone	10	g
Estratto di carne.....	1	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Bromocresolporpora.....	0.02	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 6.8 ± 0.2

CARBOIDRATI

Ramnosio
Xilosio

Sciogliere separatamente 5 g di ciascun carboidrato in 100 mL di acqua. Sterilizzare per filtrazione.

Terreno completo

Terreno base	9	mL
Soluzione di carboidrato.....	1	mL

T 36. BRODO "SALINE GLUCOSE" SODIO DUODECYL LAURYL SULFATE (GSTB)

Peptone	10	g
Estratto di carne.....	3	g
Cloruro di sodio.....	30	g
Glucosio	5	g
Metil violetto.....	0.002	g
Sodio dodecil lauril solfato	1.36	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 8.6

T 37. BRODO SALT POLYMYXINE-B (SPB)

Peptone	10	g
Estratto di lievito	3	g
Cloruro di sodio.....	20	g

pH 7.4 ± 0.2

SOLUZIONE DI POLIMIXINA B

Polimixina B.....	100.000	UI
Acqua distillata.....	100	mL

Sciogliere la polimixina nell'acqua e sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base	900	mL
Soluzione di polimixina	100	mL

Aggiungere in asepsi la soluzione di polimixina appena preparata al terreno disciolta e a temperatura 45 – 50°C , distribuire in bottiglie sterili. Utilizzare lo stesso giorno.

T 38. BRODO TRIPTONE DI SOIA con NaCl 1%

Digerito pancreatico di caseina	17	g
Digerito papainico di farina di soia.....	3	g
Sodio cloruro	5	g
Potassio fosfato monoacido.....	2.5	g
Destrosio.....	2.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

Reidrattare in acqua distillata riscaldando. Aggiungere 1 mL di NaCl all'1% per ogni 100 mL di terreno. Distribuire circa 10 mL in tubi sterilizzare a 121±3°C. Conservare a 5±3°C per un mese

T 39. BRODO TRIPTONE DI SOIA nc (TSB nc) (+NaCl 1% + 2% di sodio piruvato)

Triptosio (digerito pancreatico di caseina).....	17	g
Fitone (digerito papainico di farina di soia).....	3	g
Sodio cloruro	5	g
Fosfato di potassio monoacido.....	2.5	g
Destrosio.....	2.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Terreno completo

Terreno base	1000	mL
--------------------	------	----

Cloruro di sodio.....	95	g
Piruvato di sodio.....	19	g

pH 7.3 ± 0.2

T 40. BRODO TRIPTONE SOIA ESTRATTO DI LIEVITO (TSYEB)

Digerito di pancreatico di caseina (triptone).....	17	g
Digerito papainico di soia	3	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Potassio fosfato monoacido.....	2.5	g
Destrosio.....	2.5	g
Estratto di lievito	6	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

T 41. BRUCELLA BROTH

Triptone	10	g
Peptone pepsinico di carne.....	10	g
Glucosio	1	g
Estratto di lievito	2	g
Citrato di sodio.....	1	g
Bisolfato di sodio	0.1	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.0 ± 0.2

T 42. BUFFERED PEPTONE WATER

Peptone	10.0	g
Sodio cloruro	5.0	g
Sodio fosfato monoacido.....	3.5	g
Potassio fosfato biacido.....	1.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 43. BUTZLER AGAR MODIFICATO

COLUMBIA AGAR

Peptone	23	g
Amido	1	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

SUPPLEMENTO

Sangue lisato di cavallo sterile

SOLUZIONE ANTIBIOTICI

Cefoperazone.....	0.15	g
Rifampicina	0.10	g
Colistina	100.000	UI
Anfotericina.....	0.02	g
Acqua distillata.....	100	mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Agar Columbia	940	mL
Sangue lisato di cavallo sterile.....	50	mL
Soluzione di antibiotici	10	mL

Aggiungere il sangue lisato di cavallo sterile al terreno base raffreddato a 45°C circa, e quindi la soluzione di antibiotici e miscelare.

T 44. CAMPYLOBACTER BLOOD FREE SELECTIVE AGAR BASE (CAT)

Nutrient Broth N.2.....	25.0	g
Carbone batteriologico	4.0	g
Idrolisato di caseina.....	3.0	g
Sodio desossicolato	1.0	g
Ferroso solfato.....	0.25	g
Sodio piruvato	0.25	g
Agar	12.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.4 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare 121°C per 15 minuti.
Conservare 2 - 8°C

CCAD SELECTIVE SUPPLEMENT

Cefoperazone.....	16	mg
(Equivalente a 32 mg/L di terreno finale)		
Amfotericina B	5	mg
(Equivalente a 10 mg/L di terreno finale)		

Ricostruire il flacone con 2 mL di acqua distillata sterile

Terreno completo

Aggiungere asepticamente a 500 mL di terreno base 1 flac. di CCAD SELECTIVE SUPPLEMENT.
Mescolare e versare in piastre sterili.

T 45. CAMPYLOBACTER SELECTIVE ENRICHMENT BROTH

NUTRIENT BROTH N. 2

LAKED HORSE BLOOD 5%

CAMPYLOBACTER GOWTH SUPPLEMENT

Sodio piruvato	0.125	g
(Equivalente a 0.25 g/L di terreno finale)		
Sodio metasolfito.....	0.125	g
(Equivalente a 0.25 g/L di terreno finale)		
Solfato ferroso	0.125	g
(Equivalente a 0.25 g/L di terreno finale)		

CAMPYLOBACTER SELECTIVE SUPPLEMENT (PRESTON)

Polimixina B.....	2500	U.I.
(Equivalente a 5000 U.I./L di terreno finale)		
Rifampicina	5	mg
(Equivalente a 10 mg/L di terreno finale)		
Trimethoprim lattato	5	mg
(Equivalente a 10 mg/L di terreno finale)		
Cicloeximide	50	mg
(Equivalente a 100 mg./L di terreno finale)		

Terreno completo

Sospendere 12.5 g di Nutrient Broth N.2 in 475 mL di acqua distillata sterile. Riscaldare in bagno maria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare 121°C per 15 minuti. Raffreddare 50°C, aggiungere 25 mL di Laked Horse Blood ed 1 flacone di Campylobacter Growth Supplement ed 1 flacone di Campylobacter Selective Supplement (Preston). Distribuire 5 mL in flaconi con tappo a vite. Conservare a +4°C per 7 giorni.

T 46. C-EC AGAR

Triptosio	10	g
Triptofano.....	1	g
Peptocomplesso.....	5	g
Estratto di lievito.....	3	g
Sodio cloruro.....	5	g
Sali di bile n. 3.....	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside.....	0,08	g
4-metilumbelliferil-β-D-glucoronide.....	0,05	g
Agar Bios LL.....	13	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 6.8 ± 0.2

Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 115 ± 1°C per 15 ± 1 minuto. Distribuire in piastre sterili.

T 47. CEFSULODINA IRGASAN NOVOBIOCINA AGAR (CIN)

Terreno base

Peptone	20	g
Estratto di lievito.....	2	g
Mannitolo	20	g
Piruvato di sodio.....	2	g
Cloruro di sodio.....	1	g
Solfato di magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.01	g
Desossicolato di sodio.....	0.5	g
Rosso neutro.....	0.03	g
Cristalvioletto	0.001	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.4 ± 0.2

SOLUZIONE DI CEFSULODINA (15 mg/mL)

Cefsulodina.....	1.5	g
Acqua distillata.....	100	mL

Sterilizzare per filtrazione

SOLUZIONE ALCOLICA DI IRGASAN (4mg/mL)

Irgasan	0.4 g
Etanolo 95%	100 mL

Preparare la soluzione al momento dell'uso, o conservarla a -20°C per non più di quattro settimane.

SOLUZIONE DI NOVOBIOCINA

Novobiocina	0.25 g
Acqua distillata.....	100 mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base	997 mL
Soluzione di cefsulodina	1 mL
Soluzione alcolica di irgasan.....	1 mL
Soluzione di novobiocina	1 mL

T 48. CETRIMIODE AGAR BASE

Peptone	20 g
Magnesium chloride	1.4 g
Cetrimide (Cetiltrimethylammonium bromide)	0.3 g
Agar	16.6 g
Acqua distillata.....	1000 mL

pH 7.2 ± 0.2

Sospendere 45.3 g in 1000 mL di acqua distillata sterile aggiungere 10 mL di glicerolo. Riscaldare in b.m. bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C e distribuire in piastre sterili.

T 49. CHROMOGENIC COLIFORM AGAR

Triptosio	10 g
Triptofano.....	0.1 g
Estratto di lievito	3 g
Peptocomplex	5 g
Sodio cloruro	5 g
Sali di bile n.3.....	1.5 g
IPTG	0.1 g
XD-Gluc	0,06 g
Salmon Gal	0.15 g
Agar	13 g
Acqua distillata.....	1000 mL

pH finale 7.0 ± 0.2

Sciogliere il terreno. Autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuto. Distribuire in piastre Petri. Conservare a $+4^\circ\text{C}$ per non più di due settimane.

T 50. CHROMOGENIC E.COLI AGAR

Tryptone	20	g
Triptofano.....	1	g
Estratto di lievito.....	5	g
Sodio cloruro.....	5	g
Sali di bile n.3.....	1.5	g
Sodio fosfato bibasico.....	5	g
Potassio fosfato monobasico.....	1,5	g
XD-Gluc.....	0,06	g
Agar.....	12	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.0 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria fino a completa soluzione. Autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuto. Distribuire in piastre sterili. Conservare a $+4^\circ\text{C}$ per non più di due settimane.

T 51. CHROMOGENIC E.COLI/COLIFOR MEDIUM

Miscela cromogenica.....	20,3	g
Estratto di lievito.....	3	g
Peptone.....	5	g
Lattosio.....	2,5	g
Sodio cloruro.....	5	g
Sodio fosfato monoacido.....	3,5	g
Potassio fosfato biacido.....	1,5	g
Rosso neutro.....	0,03	g
Agar.....	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 6.8 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Distribuire in piastre sterili.

T 52. CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR

Peptone.....	10	g
Miscela di inibitori.....	12	g
Miscela di cromogeni.....	0.9	g
Agar.....	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

SUPPLEMENTO A

Agenti emulsionanti.....	11.4	mL
--------------------------	------	----

SUPPLEMENTO B

Cefsulodina.....	5 mg
Acqua distillata sterile.....	4 mL

Terreno completo

Terreno base	1000 mL
Supplemento A	11.4 mL
Sol. Di supplemento B.....	4 mL

pH 7.2 ± 0.2

Reidratare il terreno base , aggiungere il supplemento A e portare ad ebollizione agitando. Sterilizzare in autoclave a 121 ± 3°C per 15 minuti. Raffreddare a 50 ± 5°C ed aggiungere il supplemento B (ricostituito con 4 mL di acqua distillata sterile) in modo asettico. Mescolare e distribuire in piastre Petri, conservare 5 ± 3°C per non più di una settimana

T 53. m CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (m-CP) MEDIUM

m CP Agar Base

Triptosio	30	g
Estratto di lievito	20	g
Saccarosio.....	5	g
L-cisteina cloridrato	1	g
Magnesio solfato 7H ₂ O	0,1	g
Agar	15	g
Porpora di bromocresolo	0,04	g

pH finale 7.6 ± 0.2

m CP SELECTIVE SUPPLEMENT

Polimixina B solfato.....	12,5 mg (105,000 U.I.)
	Equivalente a 25 mg/l (210000 U.I./L9 di terreno finale)

Disciogliere 35,55 g di m-CP Agar Base in 500 mL di acqua distillata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere asetticamente m-CP Selective Supplement ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile. Aggiungere inoltre:

Fenolftaleina difosfato 0,5%	10 mL
Indosil β-D-glucoside 0,75%*	4 mL
	*equivale a 30 mg in 4 mL

T 54. COOKED MEAT MEDIUM

Beef heart	454	g
Proteose peptone	20	g
Dextrose	2	g
Sodium chloride	5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

Riidratare il terreno distribuendo 1.25 g in provettoni ed aggiungendo 10 mL di acqua distillata fredda, mescolare e lasciare a riposo fino a che le particelle siano perfettamente imbevute. Autoclavare a 121°C per 15 minuti, raffreddare a 37°C prima dell'uso. Il terreno se non usato lo stesso giorno della preparazione deve essere riscaldato in bagnomaria bollente o a vapore fluente per 0.0.alcuni minuti, raffreddato a 37°C ed inoculato.

T 55. CZAPEK DOX AGAR

Saccarosio.....	30.0	g
Nitrato di sodio.....	2	g
Fosfato bipotassico.....	1	g
Solfato di magnesio.....	0.5	g
Cloruro di potassio.....	0.5	g
Solfato ferroso.....	0.01	g
Agar.....	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 6.2 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria fino a completa soluzione. Autoclavare a $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Distribuire in piastre sterili. Le operazioni devono essere fatte in cappa a flusso laminare. Conservare a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane.

T 56. DEFINED SUBSTRATE TECHNOLOGY (Colilert)

Ammonio solfato.....	5	g
Magnese solfato.....	0,5	mg
Zingo solfato.....	100	mg
Sodio cloruro.....	10	mg
Calcio cloruro.....	50	g
Sodio solfito.....	40	g
Anfotericina B.....	1	g
O-nitrofenil- β -D-galattopiranoside.....	0,5	mg
4-metilumbellifenil- β -D-glucoronide.....	75	mg
Solanium.....	0,5	g

Hepes buffer

Sali di sodio.....	5,3	g
Acido organico.....	6,9	g

Il terreno in forma disidratata è distribuito in commercio in confezioni monodose per esaminare 100 mL di acqua. Risultati dopo 18 – 24 ore.

T 57. DG18 AGAR BASE

Idrolisato enzimatico di tessuti animali e vegetali	5	g
Glucosio (C ₆ H ₁₂ O ₆).....	10	g
Potassio diidrogenofosfato (KH ₂ PO ₄).....	1	g
Magnesio solfato (MgSO ₄ ·H ₂ O).....	0.5	g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilina)	0.002	g
Agar	13.5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

SUPPLEMENTI

chloranphenicol antimicrobial supplement	50	mg
Glicerina	100	mL

Terreno completo

Sospendere 15 g di terreno in 500 mL di acqua distillata fredda, portare ad ebollizione fino a completa soluzione. Aggiungere 110 g di glicerolo anidro. Ricostituire un flacone di Chloranphenicol Antimicrobial Supplement con 3 mL di acqua/etanolo 1:1 e aggiungere al terreno. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare in bagno maria a 44 – 47°C, mescolare e distribuire in piastre sterili. Conservare al riparo della luce

pH finale 5,6 ± 0.2

T 58. DRBC AGAR BASE

Idrolisato enzimatico di tessuti animali e vegetali	5	g
Glucosio (C ₆ H ₁₂ O ₆).....	10	g
Potassio diidrogenofosfato (KH ₂ PO ₄).....	1	g
Magnesio solfato (MgSO ₄ ·H ₂ O).....	0.5	g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilina)	0.002	g
Rosa bengala.....	0.025	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

CHLORANPHENICOL ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Cloranfenicolo.....	50	mg
---------------------	----	----

Terreno completo

Sospendere 15.5 g di terreno DRBC in 500 mL di acqua distillata fredda, portare ad ebollizione fino a completa soluzione, aggiungere un flacone di Chloranphenicol Antimicrobial Supplement ricostituito con 3 mL di acqua/etanolo 1:1. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare in bagno maria a 44 – 47°C, mescolare e distribuire in piastre sterili. Conservare al riparo della luce

pH finale 5,6 ± 0.2

T 59. EGG YOLK AGAR

Tryptone	5	g
Peptone	20	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.0 ± 0.2

Sterilizzare a 121°C per 20 minuti. Raffreddare 45 – 50°C e aggiungere 80 mL di Egg yolk emulsion. Distribuire in piastre.

T 60. m ENDO AGAR LES

Yeast extract.....	1.2	g
Casitone	3.7	g
Thiopeptone.....	3.7	g
Tryptose.....	7.5	g
Lactose	9.4	g
Potassiumphoshate dibasic.....	3.3	g
Potassiumphoshate monobasic.....	1	g
Sodium chloride	3.7	g
Sodium desoxycholate.....	0.1	g
Sodium lauryl sulphate.....	0.05	g
Sodium sulfite	1.6	g
Basic fuchsin	0.8	g
Agar	15.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

ALCOLE ETILICO ASSOLUTO PER ANALISI ACS, ISO

C_2H_5OH M (g/mol) = 46.07 1L = 0.79 K

Terreno completo

M Endo agar LES	51	g
Alcole etilico	20	mL
Acqua distillata.....	1000	mL

Dopo aver riidratato il terreno portare ad ebollizione per sciogliere completamente la polvere. Raffreddare a 40-50°C, distribuire in piastre e lasciar solidificare.

Conservare a 2-8°C al riparo della luce.

T 61. m FC AGAR

Tryptose.....	10.0	g
Proteose peptone N.3.....	5.0	g

Yeast extract.....	3	g
Lactose	12.5	g
Bile salts N.3	1.5	g
Sodium chloride	5	g
Aniline blue.....	0.1	g
Agar.....	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.4 ± 0.2

ROSOLIC ACID (Acido rosolico per batteriologia)

IDROSSIDO DI SODIO (NaOH)

Sciogliere 1 g di Acido Rosolico in 100 mL di soluzione di Idrossido di sodio 0.2N (soluzione all'1%).
Stabilità 2 settimane se conservata in frigorifero.

Terreno completo

m FC agar	52	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Sciogliere il terreno per ebollizione fino a completa soluzione. Aggiungere 10 mL di acido rosolico, agitare e far bollire ancora per 1 minuto.

Raffreddare a bagnomaria a 50°C e distribuire in piastre.

T 62. GLUCOSIO AGAR

Enzinatico di caseina.....	10.0	g
Estratto di carne.....	1.5	g
Glucosio	10.0	g
Sodio cloruro	5.0	g
Bromocresolo	0.015	g
Agar.....	9 -18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.0 ± 0.2

Sciogliere i componenti in acqua calda se necessario, distribuire in contenitori. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Conservare a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ massimo una settimana. Prima dell'uso immergere in acqua bollente per 15 minuti e raffreddare rapidamente alla temperatura di incubazione

T 63. HALF FRASER BROTH

Terreno base

Peptone di carne	5	g
Triptone	5	g
Estratto di cane.....	5	g
Estratto di lievito.....	5	g
Cloruro di sodio.....	20	g
Sodio fosfato monoacido.....	12	g

Potassio fosfato biacido.....	1.35	g
Esculina	1	g
Cloruro di litio.....	3	g
Acido nalidixico (sale sodico).....	0.01	g
Acqua distillata.....	1000	mL

SOLUZIONE DI ACRIFLAVINA

Acriflavina cloridrato	0.125	g
Acqua distillata.....	100	mL

SOLUZIONE DI CITRATO FERRICO AMMONIACALE

Ammonio ferrico citrato.....	5	g
Acqua distillata.....	100	mL

Terreno completo

Terreno base	100	mL
Soluzione di acriflavina.....	1	mL
Soluzione di citrato ferrico ammoniacale.....	1	mL

pH 7.2 ± 0.2

T 64. HEKTOEN ENTERIC AGAR

Proteose peptone	12.0	g
Estratto di lievito	3.0	g
Lattosio.....	12.0	g
Saccarosio.....	12.0	g
Salicina	2.0	g
Sali biliari n.3	9.0	g
Sodio cloruro	5.0	g
Sodio tiosolfato	5.0	g
Ferrico ammonio citrato	1.5	g
Fucsina acida	0.1	g
Blu di bromotimolo	0.065	g
Agar	14.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.5 ± 0.2

Sospendere il terreno in acqua distillata e lasciare sciogliere per 10 minuti. Portare ad ebollizione per pochi secondi per sciogliere l'agar. NON autoclavare. Raffreddare a 60°C e distribuire.
Conservare a 2-8°C.

T 65. IRON SULPHITE AGAR

Tryptone	10.0	g
Sodio solfito	0.5	g
Ferro citrato (ico)	0.5	g
Agar	12.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Sospendere 23 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata, scaldare in bagno maria bollente fino a completa soluzione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Mescolare e distribuire in piastre.

pH finale 7.1 ± 0.2

T 66. KARMALI AGAR (CSM)

Peptone	23	g
Amido	1	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Carbone attivato	4	g
Agar	8-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.4 ± 0.2

SOLUZIONE DI EMATINA

Ematina.....	0.32	g
Acqua distillata.....	100	mL

Sterilizzare per filtrazione

SOLUZIONE DI ANTIBIOTICI

Piruvato di sodio.....	2	g
Vancomicina.....	0.4	g
Cefaperazone	0.64	g
Cicloeximide	2	g
Etanolo	50	mL
Acqua distillata.....	200	mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base	980	mL
Soluzione di ematina	10	mL
Soluzione di antibiotici	10	mL

Aggiungere sterilmente la soluzione di ematina al terreno base raffreddato a 45 -50°C, aggiungere poi la soluzione di antibiotici e mescolare.

T 67. LACTOSE BROTH

Lab-lenco (estratto di carne)	3.0	g
Peptone	5	g
Lattosio.....	5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 6.9 ± 0.2

Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Conservare a temperatura ambiente (18-22°C)

T 68. LEGIONELLA BCYE- α GOWTH SUPPLEMENT

LEGIONELLA CYE AGAR BASE

Carbone attivo	2	g/l
Estratto di lievito	10	g/l
Agar	13	g/l

LEGIONELLA GOWTH SUPPLEMENT (SR110A)

Tampone ACES/Potassio idrossido	1.0	g
(equivalente a 10 g/L di terreno finale)		
Pirofosfato ferrico	0,025	g
(equivalente a 0.25 m/L di terreno finale)		
L-Cisteina HCL	0.04	g
(equivalente a 0.4 g/L di terreno finale)		
α -chetogluturato	0.1	g
(equivalente a 1 g/L di terreno finale)		

LEGIONELLA GOWTH SUPPLEMENT (SR110C)

Tampone ACES/Potassio idrossido	5.0	g
(equivalente a 10 g/L di terreno finale)		
Pirofosfato ferrico	0,125	g
(equivalente a 0.25 m/L di terreno finale)		
L-Cisteina HCL	0.2	g
(equivalente a 0.4 g/L di terreno finale)		
α -chetogluturato	0.5	g
(equivalente a 1 g/L di terreno finale)		

Terreno completo (Supplemento SR110A)

Legionella CYE agar base	2.5	g
Legionella Gowth supplement (SR110A)	1	flacone
Acqua distillata.....	90	mL

Sospendere 2.5 g di Legionella CYE agar base in 90 mL di acqua distillata portare a ebollizione fino a completa soluzione del terreno.

Sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C.

Ricostituire asepticamente 1 flacone di Legionella Gowth supplement (SR110A) con 10 mL di acqua distillata sterile calda ed aggiungere il contenuto ai 90 mL di Legionella CYE agar base.

Mescolare con cura e distribuire in piastre sterili.

Terreno completo (Supplemento SR110C)

Legionella CYE agar base	12.5	g
Legionella Growth supplement (SR110C)	1	flacone
Acqua distillata.....	450	mL

Sospendere 12.5 g di Legionella CYE agar base in 450 mL di acqua distillata e portare a ebollizione fino a completa soluzione del terreno.

Sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C.

Ricostituire asepticamente 1 flacone di Legionella Growth supplement (SR110C) con 50 mL di acqua distillata sterile calda ed aggiungere il contenuto ai 450 mL di Legionella CYE agar base.

Mescolare con cura e distribuire in piastre sterili.

T 69. LEGIONELLA (GVPC) SELECTIVE MEDIUM

LEGIONELLA CYE AGAR BASE

Carbone attivo	2	g/l
Estratto di lievito	10	g/l
Agar	13	g/l

LEGIONELLA GOWTH SUPPLEMENT

Tampone ACES/Potassio idrossido	5.0	g
(equivalente a 10 g/L di terreno finale)		
Pirofosfato ferrico	0,125	g
(equivalente a 0.25 m/L di terreno finale)		
L-Cisteina HCL	0.2	g
(equivalente a 0.4 g/L di terreno finale)		
α -chetoglutarato	0.5	g
(equivalente a 1 g/L di terreno finale)		

LEGIONELLA (GVPC) SELECTIVE SUPPLEMT

Glicina (priva di ioni ammonio	1.5	g
(equivalente a 3.0 g/L di terreno finale)		
Vancomicina.....	0.5	mg
(equivalente a 1.0 mg/L di terreno finale)		
Polimixina B solfato.....	39.600	U.I.
(equivalente a 79.200 U.I./L di terreno finale)		
Cicloeximide	40.0	mg
(equivalente a 80.0 mg/L di terreno finale)		

Terreno completo

Legionella CYE agar base	12.5	g
Legionella Growth supplement.....	1	flacone
Legionella (GVPC) selective supplement.....	1	flacone
Acqua distillata.....	450	mL

Sospendere 12.5 g di Legionella CYE agar base in 450 mL di acqua distillata e portare ad ebollizione fino a completa soluzione del terreno.

Sterilizzare a 121°C per 15 minuti.

Raffreddare a 50°C ed aggiungere asepticamente 1 flacone di Legionella Growth supplement previamente ricostituito con 50 mL di acqua distillata sterile.

Ricostituire con 10 mL di acqua distillata sterile 1 flacone di Legionella (GVPC) selective supplement ed aggiungerlo ai 500 mL di Legionella BCYE- α Medium sterile.

Mescolare con cura e distribuire in piastre sterili.

T 70. LISTERIA ACCORDING TO OTTAVIANI – AGOSTI (ALOA)

Enzymatic digest of animal tissues	18	g
Enzymatic digest of casein	6	g
Yest extrat	10	g
Sodium pyruvate.....	2	g
Glucose.....	2	g
Magnesium glycerophosphate.....	1	g
Magnesium sulphate (anhydrous)	0.5	g
Sodium chloride	5	g
Lithium chloride.....	10	g
Disodium ydrogen phosphate (anhdous).....	2.5	g
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside.....	0.05	g
Agar	12-18	g
Water	930	mL

Sciogliere i componenti per ebollizione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti
pH 7.2 \pm 0.2

ACIDO NALIDIXICO

Nalidixic acid sodium salt.....	0.02	g
Sodium hydroxide (0.05 mol/L).....	5	mL

Sciogliere nalidixic acid in 5 mL di sodium hydroxide e sterilizzare per filtrazione.

SOLUZIONE DI CEFTAZIDIME

Ceftazidime	0.2	g
Water	5	mL

Sciogliere cefatazimide in 5 mL di acqua e sterilizzare per filtrazione (membrana 0.45 μ m)

POLYMYXIN B SOLUTION

Polymyxin B sul fate	760700	IU
Water	5	mL

Sciogliere polymyxin B in 5 mL di acqua e sterilizzare per filtrazione (membrana 0.45 μ m)

SUPPLEMENTO ANTIBIOTICO

Cycloheximide.....	0.05	g
Ethanol	2.5	mL
Water	2.5	mL

Sciogliere cycloheximide in 2.5 mL di etanolo aggiungere 2.5 mL di acqua e sterilizzare per filtrazione (membrana 0.45 μ m)

ANPHOTERICIN B

Amphotericin B	0.01	g
HCL (1 mol/L).....	2.5	mL
Dimethylformamide (DMF).....	7.5	mL

Sciogliere amphotericin in HCL/DF e sterilizzare per filtrazione (membrana 0.45µm)

SUPPLEMENTO

Sciogliere 2 g L- α -phosphatidylinositol (Sigma P 6636) in 50 mL di acqua fredda. Agitare per 30 minuti per omogeneizzare la sospensione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti e raffreddare a 48 – 50°C.

Terreno completo

Base medium	930	mL
Nalidixic acid solution	5	mL
Ceftazidime solution	5	mL
Polymyxin B solution	5	mL
Cycloheximide solution*	5	mL
*Oppure Supplemento	50	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

T 71. LISTERIA FRASER BROTH BASE

Proteose peptone	5.0	g
Tryptone	5.0	g
Lab-Lemco (estratto di carne)	5.0	g
Estratto di lievito	5.0	g
Sodio cloruro	20.0	g
Sodio fosfato monoacido	12.0	g
Potassio fosfato biacido	1.35	g
Esculina	1.0	g
Litio cloruro	3.0	g
Acqua distillata	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

FRASER SELECTIVE SUPPLEMENT

Citrato ferrico di ammonio	250.0	mg
(equivalente a 500 mg/L di terreno finale)		
Acido nalidixico	10.0	mg
(equivalente a 20.0 mg/L di terreno finale)		
Acriflavina cloridrato	12.5	mg
(equivalente a 25.0 mg/L di terreno finale)		

Terreno completo

Listeria Fraser Broth base	28.7	g
Acqua distillata	500	mL

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C. Aggiungere asepticamente 1 flacone di Fraser Selective Supplement ricostituito con 5 mL di soluzione alcool etilico/acqua distillata sterile (rapporto 1/1). Mescolare e distribuire in contenitori sterili. Conservare a 2-8°C.

T 72. LISTERIA PALCAM AGAR BASE

Columbia Blood agar base	39.0	g
Estratto di lievito	3.0	g
Glucosio	0.5	g
Esculina	0.8	g
Citrato ferrico di ammonio	0.5	g
Mannitolo	10.0	g
Rosso fenolo	0.08	g
Litio cloruro	15.0	g
Acqua distillata	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

PALCAM SELECTIVE SUPPLEMENT

Polimixina B	5.0	mg
(equivalente a 10 mg/L di terreno finale)		
Acriflavina cloridrato	2.5	mg
(equivalente a 5 mg/L di terreno finale)		
Ceftazidime	10.0	mg
(equivalente a 20 mg/L di terreno finale)		

Terreno completo

Listeria Palcam agar base	34.5	g
Acqua distillata	500	mL

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere il contenuto di 1 flacone di Palcam Selective Supplement ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile. Mescolare e versare in piastre sterili. Conservare a 2-8°C al riparo della luce.

T 73. LYSINE IRON AGAR

Peptone batteriologico	5.0	g
Estratto di lievito	3.0	g
Destrosio	1.0	g
L-lisina	10	g
Ammonio citrate ferrico	0.5	g
Sodio tiosolfato	0.04	g
Porpora di bromocresolo	0.02	g
Agar	14.5	g

pH 6.7 ± 0.2

Sospender 34 g in un litro di acqua distillata. Riscaldare in bagnomaria fino a soluzione completa. Distribuire in provette, autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare le provette in posizione inclinata (becco di clarino)

T 74. MANNITOLO EGG-YOLK POLYMYXIN AGAR (MYP)

TERRENO BASE

Peptone	10	g
Estratto di carne.....	1	g
Mannitolo	10	g
Cloruro di sodio.....	10	g
Rosso fenolo.....	0.025	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	900	mL

pH 7.2 ± 0.2

SUPPLEMENTI (da aggiungere asepticamente dopo sterilizzazione del terreno base)

EMULSIONE DI ROSSO D'UOVO

Tuorlo d'uovo diluito 1:5 con acqua distillata sterile. Trattare 2 ore a 45°C in bagnomaria e conservare a 0-5°C per non più di 72 ore.

SOLUZIONE DI POLIMIXINA B

Polimixina B solfato (circa 100 g secondo il titolo della polvere)

.....	10^6	UI
Acqua distillata.....	100	mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base	900	mL
Soluzione di polimixina B.....	10	mL
Emulsione di rosso d'uovo.....	100	mL

T 75. MANNITOLO SALT AGAR

Lab-Lemco (estratto di carne).....	1.0	g
Peptone	10.0	g
Mannitolo	10.0	g
Sodio cloruro	75.0	g
Rosso fenolo.....	0.025	g
Agar	15.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.5 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Conservare 2-8°C.

T 76. MRS AGAR WITH TWEEN 80

Peptone	10.0	g
Estratto di carne.....	10.0	g
Estratto di lievito	5.0	g
Glucosio	20.0	g
Potassio fosfato bis.....	2.0	g
Sodio acetato	5.0	g
Ammonio citrato.....	2.0	g
Magnesio solfato	0.20	g
Manganese solfato.....	0.05	g
Tween 80	1.0	g
Agar	15.0	g

Sospendere 70,2 g di MRS Agar in 1000 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione agitando e distribuire. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. pH finale 6.4 ± 0.2 . Per un pH 5.7, come raccomandato dalla ISO 15214, acidificare in modo che dopo sterilizzazione il pH sia 5.7 ± 0.1

T 77. MUG/EC Medium

Tryptone	40	g
Salicina	1	g
Triton X 100.....	1	g
MUG.....	100	g
Acqua distillata.....	1000	mL

A 1000 mL di acqua distillata aggiungere triptone, salicina e triton X 100, sciogliere per ebollizione agitando. Raffreddare e aggiungere il MUG disciolto in 2 mL di N,N-dimetilformamide*. Sterilizzare per filtrazione (filtro 0,2 µm) e distribuire 100 µL in ciascuno dei 96 pozzetti della piastra. Disidratare in essiccatore o sotto cappa a flusso laminare.

Il terreno disidratato e pronto all'uso si trova in commercio già distribuito in piastre a 96 pozzetti corredate di nastro adesivo. * attenzione prodotto tossico e cancerogeno per contatto ed ingestione

pH 6.9 ± 0.2

T 78. MULLER-KAUFFEMANN TETRATHIONATE BROTH BASE

Tryptone	7.0	g
Peptone di soia	2.3	g
Sodio cloruro	2.3	g
Calcio carbonato.....	25.0	g
Sodio tiosolfato	40.7	g
Bile di bue	4.75	g
Acqua distillata.....	1000	mL

SOLUZIONE IODICA

Iodio.....	20	g
Potassio ioduro	25	g
Acqua distillata fino a	100	mL

Sciogliere lo ioduro di potassio in circa 5 mL di acqua distillata, aggiungere lo iodio e riscaldare dolcemente la soluzione. Portare il volume a 100 mL con acqua distillata.

SOLUZIONE AL VERDE BRILLANTE

Verde brillante.....	0.1	g
Acqua distillata.....	100	mL

Aggiungere il verde brillante all'acqua distillata, agitare fino a completa soluzione. Riscaldare a 100°C per 30 minuti, far raffreddare agitando periodicamente assicurandosi che il colorante sia completamente disciolto. Conservare in flaconi di vetro scuro al riparo della luce.

Terreno completo

Sospendere 82 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. NON AUTOCLAVARE. Raffreddare sotto i 45°C aggiungere prima dell'uso 19 mL di soluzione iodica e 9.5 mL di una soluzione allo 0.1% di verde brillante.

Conservare a 2 - 8°C.

Terreno non indicato per la crescita di *S. typhi*, *S. sendai*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*.

T 79. NUTRIENT AGAR

Lab-Lenco (Estratto di carne)	1.0	g
Estratto di lievito	2.0	g
Peptone	5.0	g
Sodio cloruro	5.0	g
Agar	15.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.4 ± 0.2

Sospendere 28 g di polvere in 1000 mL di acqua distillata. Riscaldare a bagnomaria fino a soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Dopo preparazione conservare a temperatura 2 -8°C.

T 80. OXFORD AGAR

AGAR BASE

Columbio agar base*	19.5	g
Esculina	0.5	g
Ammonio citrato ferrino.....	0.25	g
Cloruro di litio.....	7.5	g

*Columbia agar base

Peptone	11.5	g
Amido.....	0.5	g
Cloruro di sodio.....	2.5	g
Agar	5	g

SUPPLEMENTO

Cicloeximide	200	mg
Colistina solfato	10	mg
Acriflavia.....	2.5	mg
Cefotetan	1	mg
Fosfomicina.....	5	mg
Etanolo	2.5	mL
Acqua distillata.....	2.5	mL

Sciogliere i componenti nella miscela acqua-etanolo. Sterilizzare per filtrazione.

Terreno completo

Agar base.....	27.75	g
----------------	-------	---

Sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C aggiungere in asepsi il supplemento
pH 7.0 ± 0.2

Supplemento.....	5	mL
------------------	---	----

T 81. PARK SANDERS BROTH

Tryptone	10	g
Peptone pepsinico di carne.....	10	g
Glucosio	1	g
Estratto di lievito.....	2	g

Citrato di sodio	1	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Bisolfito di sodio	0.1	g
Piruvato di sodio.....	0.25	g
Acqua distillata.....	1000	mL

SUPPLEMENTI

Sangue lisato di cavallo sterile

SOLUZIONE A DI ANTIBIOTICI

Vancomicina.....	0.1	g
Trimetroprim lattato	0.1	g
Brodo brucella (vedi terreno)	50	mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base	950	mL
Sangue lisato di cavallo sterile.....	50	mL
Soluzione A di antibiotici.....	5	mL

Aggiungere il sangue lisato di cavallo sterile al terreno base raffreddato a 45°C, aggiungere quindi la soluzione di antibiotici e miscelare

La seguente soluzione di antibiotici viene aggiunta al 5% al “Terreno completo” dopo incubazione della coltura di 4 ore

Cefaperazone	0.32	g
Cicloeximide	1	g
Brodo Brucella (vedi terreno)	50	mL

Sterilizzare per filtrazione

T 82. PEPTONE MANNITOL BROMOTHYMOL AGAR (PEMBA)

TERRENO BASE

Peptone	1	g
Mannitolo	10	g
Sodio cloruro	2	g
Magnesio solfato	0.1	g
Sodio fosfato monoacido.....	2.5	g
Potassio fosfato biacido.....	0.25	g
Sodio piruvato	10	g
Blu di bromotimolo	0.12	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.2 ± 0.2

SUPPLEMENTI (Da aggiungere asepticamente dopo sterilizzazione del terreno base)

Emulsione di rosso d'uovo

Tuorlo d'uovo diluito 1:5 con acqua distillata sterile. Trattare 2 ore a 45°C in bagnomaria e conservare a 0-5°C per non più di 72 ore.

SOLUZIONE DI POLIMIXINA B

Polimixina B solfato (circa 100mg secon il titolo della polvere). 10⁶ U.I.

Acqua distillata..... 100 mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base 900 mL

Soluzione di polimixina B 10 mL

Emulsione di rosso d'uovo 100 mL

T 83. PLASMA EDTA O PLASMA CITRATO (Per coagulasi)

Plasma di coniglio reperibile anche in commercio. Reidratare il flacone con acqua distillata seguendo le istruzioni della casa produttrice. Conservare a 2 – 8°C per 15 giorni, a meno 20°C validità 30 giorni.

T 84. PLATE COUNT AGAR STANDARD (APHA)

Estratto di lievito 2.5 g

Digerito pancreatico di caseina 5.0 g

Destrosio..... 1.0 g

Agar 15.0 g

Acqua distillata..... 1000 mL

pH finale 7.0 ± 0.2

Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Distribuire in flaconi e autoclavare a 121 °C. Conservare 2-8°C.

T 85. PLATE COUNT BROTH

Yeast extract..... 5 g

Tryptone 10 g

Dextrose 2 g

Acqua distillata..... 1000 mL

pH finale 7.0 ± 0.2

Sospendere 17 g in 1000 mL di acqua distillata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 86. PRESTON AGAR

Estratto di carne..... 10 g

Peptone 10 g

Cloruro di sodio..... 5 g

Agar	12-18 g
Acqua distillata.....	1000 mL
pH 7.4 ± 0.2	

SUPPLEMENTO

Sangue lisato di cavallo sterile

SOLUZIONE ANTIBIOTICI

Polimixina B.....	100.000 UI
Rifampicina	0.2 g
Trimetropim lattato	0.2 g
Ciclomeximide	2 g
Etanolo 95%	50 mL
Acqua distillata.....	200 mL
Sterilizzare per filtrazione	

Terreno completo

Terreno base	940 mL
Sangue lisato di cavallo sterile.....	50 mL
Soluzione antibiotici.....	10 mL

Aggiungere sangue lisato di cavallo sterilizzato al terreno base raffreddato a circa 45 °C, aggiungere la soluzione di antibiotici e miscelare.

T 87. PRESTON BROTH

Estratto di carne.....	10 g
Peptone	10 g
Cloruro di sodio.....	5 g
Agar	1 g
Acqua distillata.....	1000 mL

pH 7.5 ± 0.2

SUPPLEMENTO

Sangue lisato di cavallo sterile

SOLUZIONE ANTIBIOTICI

Polimixina B.....	100.000 UI
Rifampicina	0.2 g
Trimetropim lattato	0.2 g
Ciclomeximide	2 g
Etanolo 95%	50 mL
Acqua distillata.....	200 mL
Sterilizzare per filtrazione	

Terreno completo

Terreno base	940	mL
Sangue lisato di cavallo sterile	50	mL
Soluzione antibiotici	10	mL

Aggiungere sangue lisato di cavallo sterilizzato al terreno base raffreddato a circa 45 °C, aggiungere la soluzione di antibiotici e miscelare.

T 88. PSEUDOMONAS AGAR BASE (con supplemento PP)

Peptone di gelatina	16,0	g
Idrolizzato acido di caseina	10,0	g
Potassio solfato anidro	10,0	g
Magnesio cloruro anidro	1,4	g
Agar	11,5	g

SUPPLEMENTO PP

Penicillina G	50000	UI
Pimaricina	5	mg

Terreno completo

Sospendere 24,5 g di Pseudomonas Agar Base in 500 mL di acqua distillata fredda. Scaldare fino ad ebollizione, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Ricostituire una fiala di Supplemento PP con 2 mL di acqua distillata sterile, aggiungere sterilmente a 500 mL di Pseudomonas Agar Base preparato come descritto sopra. Mescolare e distribuire in piastre sterili. Il supplemento una volta ricostituito appare torbido, ciò non altera le caratteristiche del terreno completo. pH finale 7.2 ± 0.2

T 89. PSEUDOMONAS AGAR BASE/CFC Agar

Peptone di gelatina	16.0	g
Caseina idrolisato	10.0	g
Potassio solfato	10.0	g
Magnesio cloruro	1.4	g
Agar	11.5	g
Acqua distillata	500	mL

pH finale 7.1 ± 0.2

PSEUDOMONAS CFC SELECTIVE SUPPLEMENT

Cetrimide	5.0	mg
Fucidina	5.0	mg
Cefaloridina	25.0	mg

Terreno completo (Pseudomonas CFC agar)

Sospendere 24,5 g di Pseudomonas Agar Base in 500 mL di acqua distillata fredda. Scaldare fino ad ebollizione, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Ricostituire una fiala di Supplemento CFC con 2 mL di acqua distillata sterile/etanolo (1:1), aggiungere sterilmente a 500 mL di Pseudomonas Agar Base preparato come descritto sopra. Mescolare e distribuire in piastre sterili.

T 90. PSEUDOMONAS AGAR BASE/CN-agar

Peptone di gelatina	16.0	g
Caseina idrolisato	10.0	g
Potassio solfato.....	10.0	g
Magnesio cloruro.....	1.4	g
Agar	11.0	g
Acqua distillata.....	500	mL

pH finale 7.1 ± 0.2

Sospeso il terreno in acqua distillata aggiungere 5 mL di glicerolo e riscaldare in bagnomaria bollente fino a soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti, raffreddare a 50°C

PSEUDOMONAS C-N SELECTIVE SUPPLEMENT

Cetrimide	100.0	mg
(equivalente a 200 mg/L di terreno finale)		
Acido nalidixico (sale sodico).....	7.5	mg
(equivalente a 15 mg/L di terreno finale)		

Ricostituire asepticamente il contenuto del flacone con 2 mL di miscela alcol etilico/acqua distillata sterile (rapporto 1/1). Agitare evitando formazione di schiuma fino a completa soluzione.

Terreno completo (Pseudomonas CN agar)

A 500 mL di Pseudomonas agar base, raffreddato a 50°C, aggiungere un flacone di Pseudomonas CN selective supplement. Mescolare bene e distribuire in piastre sterili.

T 91. RAMBACH AGAR

Peptone	8	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Desossicolato di sodio.....	1	g
Miscela cromogena.....	1.5	g
Glicol propilenico.....	10.5	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

PH finale 7.3 ± 0.2

Il terreno si trova in commercio. In funzione alla quantità del terreno da preparare aggiungere acqua distillata alla confezione del cromogeno. Agitare fino a dissoluzione. Aggiungere alla fiala del terreno disidratato e riscaldare agitando spesso. Il tempo di sulubilizzazione di una sospensione da 250 mL è di 20÷25 minuti, per 1000 mL 35÷40 minuti. Non sterilizzare o surriscaldare. Distribuire in piastre Petri, conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di un mese.

T 92. RAPPAPORT-VASSILIADIS SEMI-SOLID MEDIUM MODIFIED (MSRV)

Triptosio	4.590 g
Idrolisato acido di caseina	4.590 g
Sodio cloruro	7.340 g
Potassio fosfato monobasico	1.470 g
Magnesio cloruro anidro	10.930 g
Verde malachite ossalato.....	0.037 g
Agar	2.700 g
Acqua distillata.....	1000 mL

SUPPLEMENTI

Novobiocina Antimicrobial Supplement (fiala per 500 mL)

Novobiocina 10 mg

Sospender 15.8 g di MSR in 500 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione agitando. Non autoclavare. Raffreddare a 50°C e aggiungere in asepsi una fiala di Novobiocin Antimicrobial Supplement ricostituita con 5 mL di acqua distillata sterile. Mescolare e distribuire in piastre Petri

pH finale 5.2 ± 0.2

T 93. RAPPAPORT-VASSILIADIS SOYA PEPTONE (RVS) BROTH

Peptone di soia	4.5 g
Sodio cloruro	7.2 g
Potassio fosfato biacido.....	1.26 g
Potassio fosfato monoacido.....	0.18 g
Magnesio cloruro (anidro).....	13.58 g
Verde malachite.....	0.036 g
Acqua distillata.....	1000 mL

Riscaldare a bagnomaria delicatamente fino a completa soluzione. Distribuire 10 mL in flaconi con tappo e autoclavare a 115°C per 15 minuti. Conservare 2-8°C.

T 94. RINGER SOLUTION (1/4x)

Sodio cloruro	2.25 g
Potassio cloruro.....	0.125 g
Calcio cloruro (6H ₂ O)	0.12 g
Sodio bicarbonato.....	0.05 g
Acqua distillata.....	1000 mL

pH 7.0 ± 0.2

Una compressa serve per preparare 500 mL di soluzione di Ringer ¼ concentrata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 95. SABOURAUD DEXTROSE AGAR

Peptone micologico	10	g
Destrosio.....	40	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

pH 5.6 ± 0.2

Sciogliere il terreno per ebollizione, sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$. Dopo sterilizzato modificare il pH con soluzione di acido lattico sterile al 10% in modo da ottenere un pH 4.5 ± 0.2 . L'abbassamento del pH serve a ridurre la carica batterica.

T 96. SALMONELLA SHIGELLA AGAR

Estratto di carne.....	5	g
Peptocomplex	3	g
Lattosio.....	10	g
Sali biliari N. 3	8.5	g
Sodio citrato	8.5	g
Sodio tiosolfato	8.5	g
Citrato ferrino.....	1	g
Agar	13.5	g
Verde brillante.....	0.33	g
Rosso neutro.....	25	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.2 ± 0.2

Reidratare il terreno in acqua distillata fino ad ebollizione. Non sterilizzare. Distribuire in piastre Petri e conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di due settimane.

T 97. SALMONELLA SHIGELLA AGAR CON SODIO DESOSSICOLATO E SALI DI CALCIO (SSDC)

Estratto di lievito	5	g
Estratto di carne.....	5	g
Peptone di carne	5	g
Lattosio.....	10	g
Sali biliari	8.5	g
Sodio desossicolato	10	g
Cloruro di calcio.....	1	g
Sodio citrato	10	g
Sodio tiosolfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	18.5	g
Citrato ferrico	1	g
Verde brillante.....	0.0003	g
Rosso neutro.....	0.025	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.4 ± 0.2

Non sterilizzare. Portare a ebollizione per un minuto.

T 98. SELENITE BROTH BASE

Peptone batteriologico.....	5.0	g
Lattosio.....	4.0	g
Sodio solfato.....	10.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.1 ± 0.2

Sciogliere 4 g di Sodium Biselenite in un litro di acqua distillata e aggiungere 19 g di Selenite broth base. Scaldare per sciogliere. Sterilizzare in bagnomaria bollente. Non autoclavare

T 99. SKIRROW AGAR

Proteose peptone	15	g
Estratto enzimatico di fegato.....	2.5	g
Estratto di lievito.....	5	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Agar.....	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

SUPPLEMENTO

Sangue lisato di cavallo sterile

SOLUZIONE ANTIBIOTICI

Vancomicina.....	0.5	g
Trimetroprim lattato	0.25	g
Polimixina B.....	125.000	UI
Acqua distillata.....	500	mL

Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Terreno base	940	mL
Sangue lisato di cavallo sterile.....	50	mL
Soluzione di antibiotici	10	mL

Aggiungere il sangue lisato di cavallo sterile al terreno base raffreddato a 45°C circa, e quindi la soluzione di antibiotici e miscelare.

T 100. SLANETZ AND BARTLEY MEDIUM

Triptosio	20.0	g
Estratto di lievito.....	5.0	g
Destrosio.....	2.0	g
Sodio fosfato monoacido 2H ₂ O.....	4.0	g
Sodio azide	0.4	g
Tetrazolio cloruro.....	0.1	g
Agar.....	10.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.0 ± 0.2

Riscaldare, agitando frequentemente, fino a ebollizione. Evitare un riscaldamento eccessivo e la rifusione del terreno. Distribuire in piastre sterili.

T 101. SPS AGAR

Tryptone	15.0	g
Estratto di lievito	10.0	g
Sodio solfito	0.50	g
Ferrico citrato	0.50	g
Polimixina B solfato	0.01	g
Sulfadiazina	0.12	g
Agar	13.50	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.0 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione, agitando frequentemente. Autoclavare a 118°C per 15 minuti.

T 102. TAMPONE FOSFATO GELATINA

Gelatina	2	g
Fosfato di sodio monoacido	4	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 6.2 ± 0.2

T 103. TERGITOL – 7 AGAR (ISO) TTC

Peptone	10	g
Estratto di lievito	6	g
Estratto di carne.....	5	g
Lattosio.....	20	g
Blu di bromotimolo	0,05	g
Tergitol-7.....	0,1	g
Agar	13	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

SOLUZIONE DI TTC

2,3,5 Trifeniltetrazolio Cloruro (TTC).....0,125% p/v
in soluzione acquosa mL 2

Sospendere 54,15 g di Tergitol-7 Agar in acqua distillata. Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 7.2 ± 0.2 .

Raffreddare a 50°C e aggiungere 1 fiala di TTC Solution. Distribuire in piastre sterili.

T 104. TERRENO B DI BASE KING

Peptone	20	g
D-potassio idrogeno fosfato	1.5	g
Magnesio solfato eptaidrato	1.5	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Reidrattare e sciogliere per ebollizione. Aggiungere glicerolo.

GLICEROLO

Terreno completo

Terreno B di base King	1000	mL
Glicerolo.....	10	mL

pH 7.2 ± 0.2

Aggiungere ad 1 litro di terreno di base 10 mL di glicerolo. Agitare e distribuire 5 mL in tubi. Autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ al riparo della luce per non più di tre mesi.

T 105. TERRENO LATTOSIO GELATINA

Triptosio	15	g
Estratto di lievito	10	g
Lattosio.....	10	g
Gelatina	120	g
Rosso fenolo	0.05	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Sospendere gli ingredienti, escluso la gelatine ed il rosso fenolo, in 400 mL di acqua distillata agitando e riscaldando. Sospendere la gelatina in 600 mL di acqua fredda, sciogliere in b.m. a $50-60^\circ\text{C}$ agitando frequentemente. A gelatina sciolta unire le soluzioni (400+600 mL) ed aggiustare il pH a 7.5. Aggiungere il rosso fenolo. Mescolare bene e distribuire in ragione di 10 mL in provette. Sterilizzare a 121°C per 10 minuti. Il terreno se non usato entro 10 minuti dalla sua preparazione, rigenerarlo al momento dell'uso mantenendolo in b.m. a $50-70^\circ\text{C}$ per 2-3 ore, o in bagno bollente per 15 minuti.

T 106. TERRENO PER LA MOBILITA'

Tripcase	10	g
Estratto di lievito	2.5	g
Destrosio.....	5	g
Fosfato monoacido di sodio (Na_2HPO_4)	2.5	g
Agar	3.0	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.4 ± 0.2

Dissolvere in acqua bollente. Distribuire 5 mL in tubi. Sterilizzare a 121°C per 15 minuti.

T 107. TERRENO PER LA MOTILITA'- NITRATI

Estratto di carne.....	3	g
Peptone	5	g
Galattosio	5	g
Glicerolo.....	5	g
Nitrato di potassio	1	g
Fosfato di sodio monoacido (Na ₂ HPO ₄)	2.5	g
Agar	1-5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.3 ± 0.2

Prima dell'uso riscaldare in acqua bollente per 15 minuti, raffreddare rapidamente fino a 37°C

T 108. TIOSOLFATO CITRATO BILE E SACCAROSIO AGAR (TCBS)

Estratto di lievito	5	g
Sodio tiosolfato	10	g
Peptone	10	g
Sodio citrato	10	g
Bile di bue	8	g
Saccarosio.....	20	g
Sodio cloruro	10	g
Citrato ferrino.....	1	g
Blu di bromotimolo	40	g
Blu timolo.....	40	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 8.6 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione evitando il surriscaldamento.
Non sterilizzare. Distribuire in piastre Petri. Conservare a 5 ± 3°C non più di quattro settimane

T 109. TRIFENILTETRAZOLIO CLORURO SOIA TRIPTONE AGAR (TSAT)

triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Cloruro di sodio.....	30	g
Saccarosio.....	20	g
Sali biliari n.3	0.5	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.1 ± 0.2

SOLUZIONE DI TRIFENILTETRAZOLIO CLORURO (1%)

Trifeniltetrazolio cloruro.....	0.1	g
Acqua distillata.....	10	mL

Sciogliere il trifeniltetrazolio cloruro in acqua. Sterilizzare per filtrazione

Terreno completo

Trifeniltetrazolio cloruro soia triptone agar.....	1000	mL
Soluzione di trifeniltetrazolio cloruro (1%).....	3	mL

Aggiungere asetticamente la soluzione di trifeniltetrazolio cloruro (1%) appena preparata al terreno disciolto e portato a 45-50°C distribuire in bottiglie sterili.

T 110. TRIPLE SUGAR IRON AGAR (TSI)

Lab-Lemco (estratto di carne).....	3	g/L
Estratto di lievito.....	3	g/L
Peptone.....	20	g/L
Sodio cloruro.....	5.0	g/L
Lattosio.....	10	g/L
Saccarosio.....	10	g/L
Destrosio.....	1	g/L
Ferrino citrato.....	0.3	g/L
Sodio tiosolfato.....	0.3	g/L
Rosso fenolo.....	q.s.	
Agar.....	12	g/L

pH finale 7.4 ± 0.2

Sospender 65 g di polvere in un litro di acqua distillata. Riscaldare in bagnomaria sino a completa soluzione e distribuire in provette. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Lasciar solidificare a “becco di clarino”. Conservare a 2-8°C.

T 111. TRIPTOFANO BROTH

Digerito triptico di caseina.....	10	g
L-triptofano.....	1	g
Cloruro di sodio.....	5	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.5 ± 0.1

Sciogliere per riscaldamento, distribuire 3 mL in provette. Tappare e autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 112. TRIPTONE ACQUA TRIPTONATA STERILE 0.1%

Preparato ottenuto dalla digestione triptica della caseina

Triptone.....	1	g
Acqua distillata.....	1000	mL

Autoclavare 121°C per 15 minuti. Conservare 2-8°C

T 113. TRYPTICASE PEPTONE GLUCOSE YEAST EXTRACT BROTH (TPGY)

Trypticase	50	g
Bactopeptone	5	g
Estratto di lievito	20	g
Destrosio.....	4	g
Tioglicollato di sodio	1	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.0 ± 0.2

T 114. TRYPTICASE SOY AGAR (TSA)

Peptone tripticase	15	g
Fitone peptone	5	g
Cloruro di sodio.....	10	g
Agar	12-18	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH 7.2 ± 0.2

T 115. TRYPTIC SOY AGAR

Tryptone (Pancreatic digest of casein).....	15	g
Sytone (Papaic digest of soybean meal).....	5	g
Sodium chloride	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.3 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria sino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.
Terreno ad uso generale può essere usato per la preparazione di Agar Sangue o Agar cioccolato

T 116. TRYPTONE BILE AGAR (TBA)

Triptone	20	g
Sali biliari n3	1.5	g
Agar	15	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

Sciogliere 36,5 g in acqua distillata riscaldata in bagnomaria bollente fino a completa soluzione.
Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Distribuire in piastre sterili.

T 117. TRYPTONE BILE X-GLUCORONIDE MEDIUM (TBX)

Triptone	20.0	g
Sali biliari n.3	1.5	g
Agar	15.0	g
X-glucoronide.....	0.075	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.2 ± 0.2

Sospendere in acqua distillata e autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.
Distribuire in piastre Petri. Conservare a $+4^\circ\text{C}$ per due settimane

T 118. UREA AGAR (Christensen)

Peptone	1.	g
Glucose.....	1	g
Sodium Chloride (NaCl)	5	g
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2	g
Phenol red.....	0.012	g
Agar	9-18	g
Acqua disatillata	1000	mL

pH 6.8 ± 0.2

Dissolvere in acqua. Sterilizzare a 121°C per 15 minuti.

T 119. UREA BROTH BASE (Christensen)

Peptone	1.0	g
Destrosio.....	1.0	g
Sodio fosfato monoacido.....	1.2	g
Potassio fosfato biacido.....	0.8	g
Sodio cloruro	5.0	g
Rosso fenolo.....	0.004	g

pH finale 6.8 ± 0.2

Aggiungere a 0.9 g di polvere 95 mL di acqua distillata. Sterilizzare a 115°C per 20 minuti. Raffreddare a 55°C e aggiungere 5 mL di Urea al 40%. Mescolare e distribuire in provette sterili
La soluzione di Urea al 40% è reperibile in commercio e va conservata al riparo della luce a $2 - 8^\circ\text{C}$

T 120. UREA TRIPTOFANO

L-triptofano	3	g
Potassio fosfato monobasico	1	g
Potassio fosfato bibasico	1	g
Sodio cloruro	5	g
Urea	20	g
Rosso fenolo.....	0.025	g

pH 6.9 ± 0.2

Sterilizzare per filtrazione e distribuire asepticamente 0.5 mL in provette sterili.

T 121. VIOLET RED BILE GLUCOSE AGAR (VRBGA)

Estratto di lievito	3.0	gg
Peptone	7.0	gg
Sodio cloruro	5.0	gg
Sali biliari n.3	1.5	gg
Glucosio	10.0	gg
Rosso neutro	0.03	gg
Cristal violetto	0.002	gg
Agar	12.0	gg
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.4 ± 0.2

Portare delicatamente ad ebollizione in bagnomaria fino a completa soluzione.

NON autoclavare.

Raffreddare a 47°C mescolare e distribuire in piastre sterili.

T 122. VIOLET RED BILE LACTOSE AGAR (VRBLA)

Yeast extract	3	gg
Peptone	7	gg
Bile salts n.3	1.5	gg
Lactose	10	gg
Sodium chloride	5	gg
Agar	15	gg
Neutral red.....	0.03	g
Crystal violet	0.002	g
Acqua distillata.....	1000	mL

pH finale 7.4 ± 0.2

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a soluzione completa per non più di due minuti. Raffreddare a 45°C e distribuire in piastre sterili. NON autoclavare.

T 123. XILOSIO LISINA DESOSSICOLATO AGAR (XLD)

Xilosio	3.5	gg
L-lisina.....	5	gg
Lattosio.....	7.5	gg
Saccarosio.....	7.5	gg
Cloruro di sodio.....	5	gg
Estratto di lievito	3	gg
Desossicolato di sodio.....	2.5	gg
Tiosolfato di sodio.....	6.8	gg
Citrato di ferro ammoniacale.....	0.8	gg
Agar	15	gg

Acqua distillata.....1000 mL

pH 7.4 ± 0.2

Reidrattare il terreno a bagnomaria fino a ebollizione spesso agitandolo. Non surriscaldare non autoclavare. Distribuire in piastre Petri, conservare a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di una settimana.

T 124. YEAST DEXTROSE CHLORAMPHENICOL AGAR

Estratto di lievito 5 g
Destrosio..... 20 g
Cloranfenicolo 0.1 g
Agar 12-18 g
Acqua distillata.....1000 mL

pH 6.6 ± 0.2

T 125. YEAST DEXTROSE OXITETRACICLINE GENTAMYCIN AGAR

Estratto di lievito 5 g
Destrosio..... 20 g
Agar 12-18 g
Acqua distillata.....1000 mL

pH 6.6 ± 0.2

SOLUZIONE DI OSSITETRACICLINA

Ossitetraciclina 50 mg
Acqua distillata..... 50 mg

Sciogliere l'ossitetraciclina in acqua e sterilizzare per filtrazione

SOLUZIONE DI GENTAMICINA

Gentamicina..... 50 mg
Acqua distillata..... 50 mg

Sciogliere la gentamicina in acqua e sterilizzare a 121°C per 15 minuti

Terreno completo

Terreno base 100 mL
Soluzione di ossitetraciclina..... 10 mL
Soluzione di gentamicina 10 mL

Reagenti e soluzioni

R 01. CATALASI (Prova dell'attività catalasica)

Perossido di idrogeno (H₂O₂) al 3%.

Conservare in bottiglia scura a 4-8°

R 02. CITOCROMO-OSSIDASI (Prova della...)

N,N,N',N'- Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride.....5 g
Acqua..... 100 mL

Sciogliere in acqua fredda al momento dell'uso. In commercio stick già pronti per l'uso.

R 03. COAGULASI (Prova della ...)

Plasma citrato di coniglio (allo stato liofilo)
Acqua distillata sterile

Sciogliere al momento dell'uso il contenuto di un flacone con 2 mL di acqua distillata sterile.
Stabilità due giorni a 2-8°C.

R 04. GAM (Colorazione di...)

1. Ricoprire il vetrino con la soluzione di violetto di genziana (soluz. madre diluita 1:10). Lasciare agire per 5 minuti.
2. Lavare con soluzione di iodio. Lasciare agire la soluzione di iodio per 2 minuti.
3. Scolare l'eccesso di soluzione di iodio e decolorare con acetone (F.U.) per non più di 5 secondi.
4. Lavare immediatamente il vetrino con acqua .
5. Colorare con fucsina basica per 30 secondi (soluz. madre diluita 1:10).
6. Lavare con acqua e lasciare asciugare all'aria.

SOLUZIONE DI IODIO

Iodio.....2 g
NaCH 1 N..... 10 mL
H₂O distillata90 mL

SOLUZIONI ALCOLICHE MADRI

Fucsina basica3 g
Violetto di genziana4.8 g

Le soluzioni madri si preparano mettendo le quantità di coloranti sopra indicate in 100 mL di alcol assoluto (F.U.) e lasciandole a riposo per qualche giorno (meglio se a 37°C)

R 05. HOLBROOK E ANDERSON (Colorazione rapida di...)

1. Preparare lo striscio su vetrino prelevando il materiale dalla parte centrale di colonie di un giorno o dal bordo se di due giorni.
2. Far 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. Trascorsi due minuti lavare con acqua ed asciugare.
5. Colorare per 15 minuti con nero Sudan 0.3 p/v in alcol etilico 70%.
6. Lavare con xilolo per 5 secondi e asciugare.
7. Colorare con una soluzione di safranina 0.5% p/v per 20 secondi.
8. Lavare con acqua e far asciugare.

R 06. KOVAC (Reattivo di)

p-dimetilaminobenzaldeide	5	g
Alcool amilico	75	mL
Acido cloridrico concentrato (37%).....	25	mL

Sciogliere l'aldeide in alcool amilico a bagnomaria a 50-55°C. Raffreddare ed aggiungere l'acido cloridrico. Conservare al riparo della luce.

R 07. REAGENTI PER LA DETERMINAZIONE DELLA Triptofano deaminasi

Cloruro ferrino.....	1.5	g
Acqua distillata.....	20	mL

R 08. REAGENTI PER LA RICERCA DELLA β -galattosidasi

TAMPONE

Fosfato biacido di sodio (NaH_2PO_4)	6.9	g
Idrossido di sodio, ≈ 0.1 ml/L	3	mL
Acqua distillata.....	50	mL

Sciogliere il fosfato biacido di sodio in circa 45 mL di acqua. Aggiustare il pH a 7.0 con la soluzione di idrossido di sodio. Portare a volume finale di 50 mL con acqua

SOLUZIONE ONPG

Ortonitrofenil β -D-galattopiranoside (ONPG)	0.08	G
Acqua distillata.....	15	MI

Sciogliere l' ONPG in acqua a 50°C. Raffreddare la soluzione

Reagente completo

Soluzione tampone	5	mL
Soluzione di ONPG	15	MI

R 09. REATTIVI PER LA DETERMINAZIONE DEI NITRITI

NITRATE MEDIUM

Peptone	5.0 g
Estratto di carne.....	3.0 g
Nitrato di potassio	1 g
Acqua.....	1000 mL

a) SOLUZIONE DI ACIDO 5-AMINO-2-NAFTALEN SULFONICO (5-2ANSA)*

5-2 ANSA.....	0.1 g
Acido acetico 155 (v/v).....	100 mL

Disciogliere il 5-2 ANSA in acido acetico e filtrare con carta. Conservare la soluzione in contenitori di vetro scuro chiusi ermeticamente (meglio con conta gocce) a temperatura 0-5°C

* Se 5-2 ANSA non reperibile in commercio utilizzare i seguenti reagenti:

Soluzione a): Acido sulfanilico	0.8 g
Acido acetico 5 moli/L	100 mL
Soluzione b): Naftolo	0.5 g
Acido acetico 5 moli/L	100 MI

b) SOLUZIONE DI ACIDO SULFAMILICO

Acido sulfamidico	0.4 g
Acido acetico 15% (v/v).....	100 mL

Sciogliere l'acido sulfamidico in acido acetico e filtrare con carta. Conservare in contenitori di vetro scuro chiusi ermeticamente (meglio con conta gocce) a temperatura 0-5°C

Preparazione del reagente completo

Prima dell'uso miscelare in parti uguali la soluzione a) e b). Il reagente così preparato va utilizzato immediatamente, la quantità non utilizzata deve essere eliminata.

R 10. REATTIVI PER LA REAZIONE DI VOGES-PROSKAUER

VOGES-PROSKAUER MEDIUM (VP)

Peptone	7.0 g
Glucosio	5.0 g
Potassio fosfato bibasico	5.0 g
Cloruro di sodio.....	5.0 g
Acqua distillata.....	1000 mL

pH 7.0

Distribuire 5 mL in provette ù

SOLUZIONE DI α -NAFTOLO

α -Naftolo	5 g
Etanolo 96% (v/v)	100 mL

Sciogliere l' α -naftolo nell'alcol. Conservare la soluzione in contenitori marroni chiusi ermeticamente a 0-5°C

SOLUZIONE DI IDROSSIDO DI POTASSIO

Idrossido di potassio.....40 g
Acqua distillata..... 100 mL

CREATININA IN CRISTALLI

R 11. REATTIVO AL 4-METIL UMBELLIFERIL CAPRILATO

4-metil umbelliferil caprilato 1 %
Eptano.....99 %

Prodotto brevettato reperibile in commercio

R 12. REATTIVO DI NESSLER

Cloruro di mercurio..... 10 g
Potassio ioduro 7 g
Idrossido di sodio 16 g
Acqua distillata

Soluzione disponibile in commercio. Sciogliere il cloruro di mercurio e lo ioduro di potassio in un volume ridotto di acqua distillata. Mescolare ed aggiungere lentamente idrossido di sodio precedentemente disciolto in 50 mL di acqua distillata. Portare a volume di 100 mL. Onservare in bottiglie di vetro borosicato con tappo di gomma, al riparo della luce e per non più di un anno. Soluzione tossica, precauzioni nel manipolarla, usare guanti, mascherina e cappa aspirante.

R 13. REATTIVO MUCAP

Disponibile in commercio. Contiene un estere a otto atomi di carbonio coniugato con metelumbelliferone in solvente organico. Conservare a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Manipolare con precauzione.

R 14. REATTIVO PRODUZIONE DI INDOLO

p-dimetilaminobenzaldeide0.5 g
Acido cloridrico..... 100 mL
C(HCl) = 1 mol/L

Irritante fare attenzione. Sciogliere la p-dimetilaminobenzaldeide in acido cloridrico. Conservare al riparo della luce a $5 \pm 3^\circ\text{C}$

R 15. SOLUZIONE DI ACIDO LATTICO AL 10%

Acido lattico 10 mL
Acqua distillata.....90 mL

Mettere in un pallone 10 mL di acido lattico e portare a 100 mL con acqua distillata.

R 16. SOLUZIONE DI BLU LATTOFENOLO

Colorante per microscopia reperibile in commercio

R 17. SOLUZIONE DI DESOSSICOATO

Sodio desossicolato0.5 g
Acqua distillata..... 100 mL

Sciogliere il desossicolato in acqua distillata. Preparare la soluzione al momento dell'uso. La soluzione serve per il test di String.

R 18. SOLUZIONE DILUENTE

Acqua di mare sintetica22.5 g
Soluzione di blu di bromofenolo 10 g
Acqua distillata..... 1000 mL

Miscelare gli ingredienti e autoclavare per 15-20minuti a $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$
Soluzione di bromofenolo si prepara aggiungendo 0.04 g a 100 mL di etanolo al 50%, la sua aggiunta è facoltativa, ma è utile per la colorazione della soluzione diluente.

R 19. SOLUZIONE DI TRIPSINA

Mettere 1.5 g di tripsina 1:250 Difco in 100 mL di acqua distillata sterile. Lasciare a temperatura ambiente e agitare spesso fino a che la maggior parte di tripsina è disciolta Sterilizzare per filtrazione e refrigerare.

R 20. SOLUZIONE FISIOLÓGICA STERILE

Cloruro di sodio.....0.9 g
Acqua distillata..... 100 mL

Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

R 21. SOLUZIONE IDROSSIDO DI SODIO NaOH 0.1 N

Idrossido di sodio4 g
Acqua distillata..... 1000 mL

Sciogliere in acqua distillata, agitando con barretta magnetica fino a dissoluzione.

4

Indicazioni validazione metodi
Stima incertezza
Espressione dei risultati
Tabelle

$$G_{m-1}^2 = 2 \times \left[\sum_{i=1}^m \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m c_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right]$$

$$G_{L-1}^2 = 2 \times \left[\sum_{i=1}^L c_i \ln \frac{c_i}{R_i} - \left(\sum_{i=1}^L c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^L c_i}{\sum_{i=1}^L R_i} \right) \right]$$

$$G_{L-1}^2 = 2 \times \left[\sum_{j=1}^L g_j \times \ln g_j - \left(\sum_{j=1}^L g_j \right) \times \ln \left(\frac{\sum_{j=1}^L g_j}{n} \right) \right]$$

$$G_{L-1}^2 = 2 \times \left[\sum_{j=1}^L g_j \times \ln g_j - \left(\sum_{j=1}^L g_j \right) \times \ln \left(\frac{\sum_{j=1}^L g_j}{n} \right) \right]$$

Definizioni

Tutte le definizioni utilizzate in questo lavoro sono riferibili ed accettate a livello internazionale e nazionale. Alcuni termini usati e non definiti dalle norme devono essere intesi nel loro significato secondo l'utilizzo degli AA nel presente lavoro.

Analita o misurando

Quantità particolare sottoposta a misurazione. In microbiologia consiste in particelle viventi denominate unità formanti colonie (UFC), particelle formanti colonie (PFC), germi ecc., e la quantità di colonie osservate è un'approssimazione del numero di particelle viventi.

In microbiologia, l'analita è teoricamente definito come un elenco di specie definite in modo tassonomico. In molti casi, in pratica, l'analita può essere definito solo da designazioni di gruppi meno accurate delle definizioni tassonomiche (UNI ENV ISO 13843:2003)

Accuratezza relativa

Grado di corrispondenza tra la risposta ottenuta dal metodo di riferimento e la risposta ottenuta dal metodo alternativo su campioni identici. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Coefficiente di variazione (CV)

Scarto tipo relativo per una caratteristica non negativa equivalente al rapporto tra scarto tipo e media. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Il rapporto può essere espresso come percentuale.

Il termine "scarto tipo relativo" è talvolta utilizzato come alternativa a "coefficiente di variazione", ma tale utilizzo non è raccomandato. [ISO 3534-1:1993, 2.35]

Il termine coefficiente di variazione (CV) è utilizzato quando lo scarto tipo relativo è espresso in percentuale (CV% = 100 RSD).

Conte parallele

Numeri di colonie o particelle in porzioni analitiche uguali tratto dalla stessa sospensione. (UNI ENV ISO 13843 :2003)

Conteggio delle colonie confermato (verificato) x

Conteggio presunto delle colonie con correzione dei falsi positivi: (UNI ENV ISO 13843:2003)

c = è il conteggio presunto;

p = è la vera frequenza positiva;

n = è la vera frequenza positiva;

k = è il numero confermato.

$$x = pc = \frac{k}{n}c$$

Differenza relativa

Differenza tra due valori misurati divisa per la loro media. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Per tutte le finalità pratiche, lo stesso valore risulta dal calcolo $d = \ln(x_A) - \ln(x_B)$.

$$d = \frac{x_A - x_B}{x} = \frac{2(x_A - x_B)}{x_A + x_B} \quad d\% = 100d$$

Diluizione

Quantità ottenuta miscelando un volume misurato della sospensione madre con un volume di diluente pari a n volte il volume suddetto. L'operazione può essere ripetuta k volte fino ad ottenere una serie di diluizioni desiderate per inoculare i terreni di coltura. Per $n=9$ diluizione decimale definita come 10^{-k} . Per $k=2$ avremo 10^{-2} espresso anche come 0,01.

Distribuzione di Poisson

Modello matematico in grado di descrivere la dispersione completamente casuale dei numeri di particelle presenti una sospensione perfettamente miscelata.

Errore di sovrapposizione o errore di affollamento

Depressione sistematica dei conteggi delle colonie causata dalla confluenza delle colonie.(UNI ENV ISO 13843:2003)

Quantitativamente, l'errore di sovrapposizione dipende principalmente dalla frazione dello spazio di crescita disponibile occupato dalla crescita delle colonie.

Fattore di copertura (k_p)

E' un fattore numerico utilizzato come moltiplicatore dell'incertezza tipo composta per ottenere un'incertezza estesa ad un determinato livello di probabilità.

Alcuni valori del fattore di copertura k_p che generano un intervallo di fiducia (confidenza) p , nel caso di distribuzione normale, sono di seguito riportati: (UNI CEI ENV13005 :2000 , p.to 2.3.6).

Livello p (%)	Fattore di copertura k_p
50	0,674
60	0,842
68,27	1,000
80	1,282
90	1,645
91	1,695
92	1,751
93	1,812
95	1,960
95,45	2,000
96	2,054
97	2,170
98	2,326
99	2,576
99,73	3,000
99,9936	4,000

Fattore di sovradisersione (u)

Incertezza casuale addizionale della determinazione in eccesso della distribuzione di Poisson, misurata in termini di scarto tipo relativo. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Germe

Entità vivente in grado di produrre crescita in un terreno nutritivo (UNI ENV ISO 13843 :2003)

Gradi di libertà

Valore equivalente a $n-1$, n corrisponde al numero dei dati sperimentali e può essere indicato con il simbolo ν

Gruppo di rivelazione o gruppo rivelatore

Combinazione di piastre o provette su cui si basa la stima quantitativa della concentrazione microbica in un campione. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Il gruppo di rivelazione è un gruppo di piastre o provette utilizzato per la stima numerica di un singolo valore.

Ad esempio: piastre parallele di una sospensione, piastre da diluizioni consecutive, sistema MPN con 3 x 5 provette, piastra di microtitolazione.

Incertezza

Parametro associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuiti al misurando (p.to 3.9 VIM – Vocabolario Internazionale dei termini fondamentali e generali in metrologia ,1993)

Incertezza estesa

Grandezza che definisce , intorno al risultato di una misurazione, un intervallo che ci si aspetta comprendere una frazione rilevante della distribuzione di valori ragionevolmente attribuibili al misurando (UNI CEI ENV13005 :2000 , pto 2.3.5).

Per poter associare uno specifico livello di fiducia all'intervallo definito dall'incertezza estesa è necessario fare ipotesi, esplicite o implicite, sulla distribuzione di probabilità caratterizzata dal risultato della misurazione e dalla sua incertezza tipo composta.

Il livello di fiducia che può essere attribuito a questo intervallo può essere conosciuto solo nei limiti entro i quali quelle ipotesi siano giustificate.

L'incertezza estesa, ipotizzando ad esempio una distribuzione normale dei risultati delle misurazioni effettuate, può essere stimata ad un livello di probabilità del 95%,moltiplicando l'incertezza composta per il fattore di copertura (vedi 3.46) di 1,960 che in genere è approssimato a 2.

Incertezza tipo

Incertezza del risultato di una misurazione espressa come scarto tipo

(UNI CEI ENV 13005 :2000, P.TO 2.3.1).

Incertezza tipo composta o incertezza composta

Incertezza tipo del risultato di una misurazione allorquando il risultato è ottenuto mediante i valori di un certo numero di altre grandezze. Essa è uguale alla radice quadrata positiva di una somma di termini, che sono le varianze o le covarianze di quelle grandezze, pesate secondo la variazione del risultato della misurazione al variare di esse. (UNI CEI ENV13005 :2000 , pto 2.3.4).

Incertezza della misurazione

Parametro, associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando. (VIM, p.to 3.9, UNI ENV 13005, p.to B.2.18)

Incertezza di conteggio

Scarto tipo relativo dei risultati del conteggio ripetuto delle colonie o particelle della/e stessa/e piastra/e o campo/i nelle condizioni concordate. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Le condizioni concordate possono essere per esempio la stessa persona o persone diverse in un unico laboratorio, oppure laboratori diversi.

Intervallo di applicazione

Intervallo di concentrazioni di particelle sottoposte correntemente a misurazione mediante un metodo. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Intervallo di validazione

Intervallo del numero medio di particelle per porzione analitica per il quale l'obbedienza alle specifiche di validazione (in particolare la linearità) è stata accettabilmente dimostrata. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Limite di determinazione

Concentrazione media minima delle particelle (x) per porzione analitica, dove l'incertezza tipo relativa attesa è uguale a un valore specificato (RSD). (UNI ENV ISO 13843:2003)

Esempio di calcolo di x assumendo che le particelle seguano la distribuzione di Poisson per RSD=0,20

$$x = \frac{1}{(\text{RSD})^2} = \frac{1}{(0,20)^2} = 25$$

Limite di rivelazione

Numero di particelle (x) per porzione analitica dove la probabilità p_0 di un risultato negativo è uguale al 5% (UNI ENV ISO 13843:2003)

Esempio di calcolo di x assumendo che le particelle seguano la distribuzione di Poisson:

$$\text{probabilità di un risultato positivo } p(+)=1-p_0. \quad x = \ln\left(\frac{1}{p_0}\right) = \ln\left(\frac{1}{0,05}\right) = \ln(20) = 3,00$$

Linearità

Dipendenza lineare del segnale dalla concentrazione dell'analita. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Materiale di riferimento (MR)

Materiale o sostanza i cui valori di una o più proprietà sono sufficientemente omogenei e ben stabiliti da essere impiegati nella taratura di uno strumento, per la valutazione di un metodo di misurazione, o per l'assegnazione di valori a materiali. (VIM,p.to 6.13 e Guida ISO 30,p.to 2.1)

Materiale di riferimento certificato (MRC)

Materiale di riferimento, accompagnato da un certificato, i cui valori di una o più proprietà sono certificati da un procedimento che stabilisce la riferibilità ad una accurata realizzazione dell'unità nella quale i valori delle proprietà sono espressi e per cui ciascun valore certificato è accompagnato da un'incertezza con un livello di fiducia stabilito. (VIM p.to 6.14 e Guida ISO 30, p.to 2.2)

Metodo di prova microbiologico qualitativo

Metodo di analisi la cui risposta è la presenza o assenza dell'analita in una determinata quantità di campione.

Metodo normato utilizzato per identificare una specie o un gruppo di batteri presenti per unità di peso o volume di matrice. Il risultato è espresso: presenza – assenza / g o mL.

Metodo di prova microbiologico quantitativo (conteggio /enumerazione su piastra)

Metodo normato utilizzato per identificare una specie o un gruppo di batteri presenti in una matrice e determinare il numero delle cellule vitali per unità peso o volume.

Il risultato è espresso come UFC/g o mL

Metodi normalizzati

Metodi definiti da leggi, norme, regole tecniche. In particolare:

- Metodi di legge: metodi prescritti da leggi, decreti, direttive CE;
- Metodi normati: metodi emessi da enti normatori internazionali (ISO, CEN) o nazionali (UNI, DIN, AFNOR, BSI ecc.);
- Metodi ufficiali: metodi emessi da organizzazioni tecniche riconosciute, pubbliche o private (EPA,IRSA,UNICHIM,ISTISAN,APHA,AOAC,FDA, ASTM ECC.)

Numero più probabile (MPN – Most Probable Number)

Numero più probabile di microrganismi riferito ad una quantità di alimento. La stima è ricavata dalla combinazione di risultati positivi e negativi ottenuti da una serie di provette inoculate con quantità diluite del campione in esame.

Precisione

Grado di concordanza fra risultati di prova indipendenti ottenuti nelle condizioni stabilite. (ISO 5725/1, p.to 3.12 e , UNI ISO 3534-1, p.to 3.14)

Recupero

Termine generale per il numero di particelle stimato in una porzione di prova o campione, con l'accordo che vi sia un numero vero (sebbene sconosciuto) di particelle delle quali il 100% o meno è "recuperato" dal rivelatore. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Recupero relativo

Rapporto (A/B) dei conteggi delle colonie ottenuto dai due metodi sottoposti a prova su porzioni di prova uguali della stessa sospensione, dove B è il riferimento (quando applicabile). (UNI ENV ISO 13843:2003)

Robustezza

Insensibilità di un metodo analitico alle piccole variazioni nel procedimento. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Ripetibilità

Precisione nelle condizioni in cui i risultati vengono ottenuti con lo stesso metodo, su materiali identici, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura ed entro tempi brevi. (ISO 5725, p.to 1, 3.13 e UNI ISO 3534-1, p.to 3.15)

Riproducibilità

Precisione nelle condizioni in cui i risultati sono ottenuti con lo stesso metodo su entità di prova identiche, in laboratori differenti, da operatori diversi usando apparecchiature diverse. (ISO 5725/1, p.to 3.17 e UNI ISO 3534-1, p.to 3.20)

Rivelatore o rivelatore di particelle

Piastra di matrice solida o provetta di liquido contenente un mezzo nutritivo per il conteggio o la rivelazione delle particelle microbiche viventi. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Porzione analitica o porzione di prova

Volume di sospensione di particelle inoculato in un'unità rivelatore. Come ad esempio le piastre di agar, le provette di prova, filtri a membrana etc. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Propagulo

Un'entità vitale, cellula vegetativa, gruppo di cellule, spora, grappolo di spore, o un pezzo di micelio micotico in grado di crescere in un terreno nutritivo. (UNI ENV ISO 13843 :2003)

Proporzionalità

Concordanza delle conte di particelle osservate con il volume (o diluizione) di una serie di porzioni analitiche da una sospensione radice comune. (UNI ENV ISO 13843:2003)

La proporzionalità è calcolata per la valutazione statistica come la statistica del rapporto di verosimiglianza logaritmico G^2 con $n-1$ gradi di libertà.

Prova collaborativa

Metodo o prova di prestazioni dei laboratori in cui diversi laboratori si uniscono in un esperimento pianificato e coordinato da un laboratorio principale. (UNI ENV ISO 13843:2003)

Le prove collaborative sono principalmente di due tipi.

- a) Gli esercizi di intertaratura sono effettuati per consentire ai laboratori di confrontare i loro risultati analitici con quelli degli altri laboratori partecipanti.
- b) Le prove prestazionali del metodo producono stime di precisione (ripetibilità, riproducibilità) dai dati accumulati quando i diversi laboratori partecipanti studiano campioni identici con un metodo strettamente normalizzato

Scarto tipo relativo (RSD)

Stima dello scarto tipo di una popolazione (s) da un campione di n risultati diviso per la media di tale campione (UNI ENV ISO 13843:200)

$$(\bar{x}) \text{ RSD} = \frac{s}{\bar{x}}$$

Sensibilità

Frazione del numero totale di colture positive o colonie correttamente assegnate nell'esame presunto. In altri termini la sensibilità esprime la probabilità, espressa come percentuale, che un risultato positivo sia effettivamente positivo

$$\text{Sensibilità} = \frac{P}{P + FN} \times 100$$

P = Risultato positivo
FN = Falso negativo

Sovradispersione

Variazione in eccesso della casualità della distribuzione di Poisson.

Specificità

Frazione del numero totale di colture negative o colonie correttamente assegnate nell'esame presunto. Esprime la probabilità, espressa come percentuale, che un risultato negativo sia effettivamente tale.

In altri termini la specificità esprime la probabilità, espressa come percentuale, che un risultato negativo sia effettivamente negativo.

$$\text{Specificità} = \frac{N}{N + FP} \times 100$$

N = Risultato negativo
FP = Falso positivo

Unità Formanti Colonie (UFC)

Consigliato in alcune norme (UNI ENV ISO 13843:2003) è ormai entrato nell'uso quotidiano nei laboratori di prova microbiologici. Nella UNI 10647 è definito come il numero di cellule microbiche presenti in un terreno di crescita dalle quali si sviluppano colonie rilevabili visivamente.

Il numero di UFC si esprime in funzione del volume o della massa del campione esaminato.

Validazione di un metodo analitico

E' la conferma attraverso esame e con apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono soddisfatti. (UNI CEI EN ISO/IEC 17025 ,p.to 5.4.5.1).

Validazione primaria o validazione completa di un metodo microbiologico

Determinazione delle specifiche per le prestazioni di un nuovo metodo microbiologico e/o verifica sperimentale che il metodo soddisfi i criteri di qualità derivati per via teorica. (UNI ENV ISO 13843:2003).

La validazione primaria è un processo sperimentale di tipo esplorativo il cui scopo è stabilire i limiti operativi e le prestazioni (performance) caratteristiche di: un nuovo metodo; o un metodo modificato o anche di un metodo insufficientemente caratterizzato

Validazione secondaria di un metodo microbiologico

Dimostrazione per via sperimentale che un metodo microbiologico stabilito funziona in conformità alle sue specifiche presso l'utilizzatore. (UNI ENV ISO 13843:2003).

La validazione secondaria (definita anche verifica) si realizza quando in un laboratorio si utilizza un metodo sviluppato e normato (validazione primaria) da altri allo scopo di assicurazione della qualità dei risultati ottenuti con l'uso rutinario del metodo.

La validazione secondaria consiste nel dare evidenza che il laboratorio applicando un metodo normato è capace di corrispondere alle specifiche stabilite nella validazione primaria.

La validazione secondaria in genere seleziona e usa semplificandole le procedure utilizzate nella validazione primaria ma valutandone le prestazioni del metodo a lungo termine (es. predisponendo apposite carte di controllo).

4.1 Validazione metodi di prova microbiologici

Il processo di validazione di un metodo microbiologico presuppone che i fattori critici più importanti siano adeguatamente disciplinati da indicazioni efficaci nel ridurre i loro effetti indesiderati sui risultati finali. Tali fattori sono:

- la rappresentatività dell'aliquota di prova rispetto al campione da analizzare;
- il tempo trascorso tra il campionamento e l'esecuzione della prova;
- la temperatura di conservazione fino all'inizio delle prove;
- i tempi e le temperature di incubazione;
- le prestazioni (selettività, produttività, specificità) dei mezzi colturali o delle prove di identificazione e /o di conferma (specificità, sensibilità), (prove di crescita, biochimiche, sierologiche o di biologia molecolare);
- la competenza del personale impiegato nell'esecuzione delle prove.

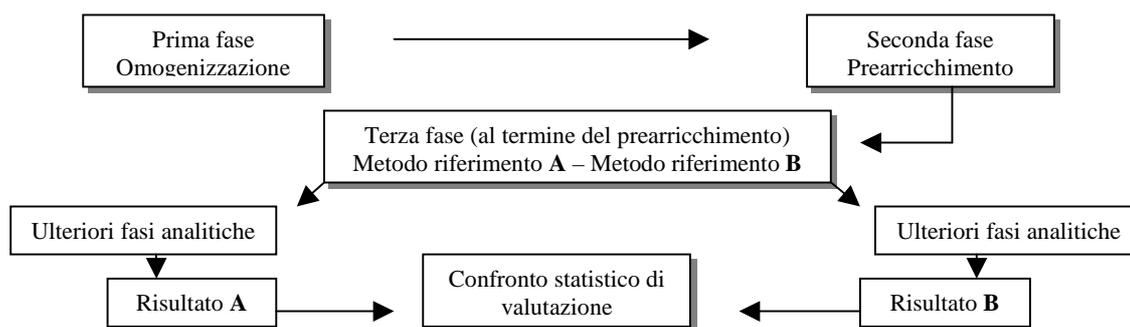
4.1.1 Validazione metodi di prova microbiologici qualitativi

La pianificazione del processo di validazione di un metodo qualitativo presuppone di un modello sperimentale. La presentazione del metodo qualitativo in studio possono essere determinate con l'utilizzo di una tecnica o con la combinazione delle seguenti tecniche:

- Confronto con altro metodo di cui si conoscono le prestazioni (metodo di riferimento)
- Prove su campioni a valore noto (circuiti interlaboratorio o campioni contaminati in laboratorio)

4.1.1.1 Validazione mediante confronto dei risultati ottenuti con un metodo di riferimento

Schema di processo analitico:



I risultati ottenuti sono trattati come al punto 4.1.1.2.1 *Raccolta e classificazione dei risultati* e 4.1.1.2.2 *Elaborazione dei risultati, valutazione dei seguenti parametri*

4.1.1.2 Validazione mediante prove su campione a valore noto

I campioni a valore noto contaminati sperimentalmente in laboratorio devono avere contaminazione a valore medio basso (100-1000 batteri target/g) e mantenere il più possibile la flora batterica caratteristica alla flora contaminata.

Le matrici esaminate devono essere rappresentative delle matrici rientranti nel campo di applicazione del metodo stesso.

4.1.1.2.1 Raccolta e classificazione dei risultati

I dati della sperimentazione sono così classificati (i risultati ottenuti con il metodo di riferimento sono assimilabili ai valori definiti come “valore vero” dei circuiti interlaboratorio o dei campioni contaminati in laboratorio):

Metodo da validare	Metodo di riferimento (valore vero)	Classificazione
+	+	Positivi (P)
-	-	Negativi (N)
+	-	Falsi positivi (FP)
-	+	Falsi negativi (FN)

4.1.1.2.2 Elaborazione dei risultati, valutazione dei seguenti parametri

$$\text{Sensibilità } S = \frac{P}{P + FN} \times 100 \text{ (1)} \quad \text{Specificità } Sp = \frac{N}{N + FP} \times 100 \text{ (2)} \quad \text{Accuratezza } A = \frac{P + N}{P + N + FP + FN} \times 100 \text{ (3)}$$

4.1.1.3 Criteri di valutazione delle prestazioni del metodo

Somma dei falsi positivi e falsi negativi $Y = FP + FN$

a) Se $Y < 6$ Non è possibile applicare alcuna analisi statistica
Criteri di valutazione della prestazione del metodo sono riportati nella tabella:



Parametro	Valore
Sensibilità (S)	$\geq 95\%$
Specificità (Sp)	$\geq 95\%$
Accuratezza (A)	$\geq 95\%$

b) Se $6 \leq Y \leq 22$, scegliere tra FP e FN quello con il valore più basso ed indicarlo con **m**, confrontare **m** con il valore **M** riportato nella tabella seguente:

Y	6 - 8	9 - 11	12 - 14	15 - 16	17 - 19	20 - 22
M per $\alpha > 0.05$	0	1	2	3	4	5

c) Se $m > M$ il metodo risulta idoneo per $p > 0,95$

d) Se $Y > 22$ $\chi^2 = \frac{(|FP - FN| - 1)^2}{(FP + FN)}$ (4) il metodo risulta idoneo, per $p > 0,95$, se $\chi^2 \leq 3,841$

4.1.2 Validazione metodi di prova microbiologici quantitativi. Valutazione delle capacità degli operatori a eseguire le prove

Preliminare alla pianificazione del processo di validazione dei metodi quantitativi è la necessità di verificare le capacità tecniche degli operatori ad eseguire le prove. La valutazione delle prestazioni degli operatori è eseguita attraverso la valutazione della ripetibilità (precisione) del conteggio delle unità formanti colonie (UFC) sviluppatasi nelle piastre.

4.1.2.1 Modalità operative

Sono esaminate nella stessa mattinata una serie di piastre con contaminazione 15-300 UFC per piastra, ripetendo la conta almeno una volta. Di ogni serie di conte della stessa piastra sono calcolate la media, lo scarto tipo e lo scarto tipo relativo. La ripetibilità di conteggio dell'operatore è calcolata con la valutazione della media quadratica degli scarti tipo alle singole serie di conte.

Esempio:

				$C_m = \frac{\sum_1^n (C_1)}{n}$	$s = \sqrt{\frac{\sum_1^n (C_m - C_i)^2}{(n-1)}}$	$RSD = \frac{s}{C_m}$
Operatore	Piastra	1° conta	2° conta	Media	Scarto tipo	Scarto tipo relativo
A	1	129	122	125,5	4,95	0,0394
A	2	417	377	397	28,28	0,0712
A	3	73	80	76,5	4,95	0,0647
A	4	49	52	50,5	2,12	0,0420
B	5	86	81	83,5	3,54	0,0423
B	6	37	39	38	1,41	0,0372
B	7	112	115	113,5	2,12	0,0187
B	8	204	214	209	7,07	0,0338
B	9	66	71	68,5	3,54	0,0516
B	10	306	299	302,5	4,95	0,0164

Calcolo della ripetibilità dell'operatore A

$$(5) \quad RDS_A = \sqrt{\frac{\sum_1^n RDS_{Ai}^2}{n}} = \sqrt{\frac{0,0394^2 + 0,0712^2 + 0,0647^2 + 0,0420^2}{4}} = 0,056$$

Calcolo della ripetibilità dell'operatore B

$$RDS_B = \sqrt{\frac{\sum_1^n RDS_{Bi}^2}{n}} = \sqrt{\frac{0,0423^2 + 0,0372^2 + 0,0187^2 + 0,0338^2 + 0,0516^2 + 0,0164^2}{6}} = 0,036$$

Calcolo della ripetibilità del laboratorio

$$(6) \quad RDS_l = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (RSD_{X_i})^2}{n}} = \sqrt{\frac{0,056^2 + 0,036^2}{2}} = 0,047$$

4.1.2.1.1 Criteri di accettabilità della ripetibilità di conteggio dell'operatore

Nel caso di letture effettuate su terreni colturali non selettivi o su coltura pura, con colonie ben separate: $RSD < 0,02$ $CV < 2\%$

Nel caso di letture in terreni differenziali con colture miste: $RSD \leq 0,1$ $CV \leq 10\%$

4.1.2.2 Pianificazione del processo di validazione di un metodo quantitativo

Il modello statistico in grado di descrivere i dati ottenuti dalle conte su piastra è la distribuzione di Poisson. I riferimenti fondamentali di tale modello sono:

$$\text{Media } (\mu) : \mu = \bar{C} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n c_i \quad (7) \qquad \text{Varianza: } \sigma^2 = \bar{C} \quad (8)$$

$$\text{Scarto tipo: } \sigma = \sqrt{\bar{C}} \quad (9) \qquad \text{Scarto tipo relativo: } RDS = \frac{\sigma}{\bar{C}} = \sqrt{\frac{1}{\bar{C}}} \quad (10)$$

Applicando il modello di Poisson, la dispersione dei dati è funzione del numero di colonie rilevate nelle piastre e, a differenza della distribuzione normale o di Gauss, non dipende dai valori delle singole osservazioni e dal numero delle osservazioni eseguite.

Quindi, in tale contesto statistico, la valutazione della dispersione dei dati, attraverso l'uso dello scarto tipo, non fornisce alcuna informazione sulle prestazioni del metodo.

Le prestazioni del metodo quantitativo possono essere determinate con l'utilizzo di una tecnica o una combinazione delle seguenti tecniche:

1. il confronto con un altro metodo di cui si conoscono le prestazioni (metodo di riferimento)
2. prove su un campione noto
 - a. partecipazione ad un circuito interlaboratorio
 - b. utilizzo di un materiale certificato
3. analisi della sovradisersione dei dati osservati sperimentalmente (verifica del grado di accordo con il modello)

4.1.2.2.1 Validazione di un metodo per confronto dei risultati ottenuti con un metodo di riferimento

La sperimentazione è condotta applicando almeno 10 volte la prova in parallelo con i due metodi e valutando i risultati mediante la seguente espressione:

$$\chi_{sp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{C})^2}{\bar{C}} \quad (11)$$

La dispersione dei dati risulta accettabile quando il valore del χ^2 (chi-quadrato), calcolato sperimentalmente (χ_{sp}^2) risulta uguale o inferiore a quello tabulato ($\chi_{g.l.}^2$) sulla base del livello di probabilità prescelto, in genere del 95%, e dei gradi di libertà stimati sulla base del numero delle prove replicate diminuiti di una unità:

$$\chi_{sp}^2 \leq \chi_{g.l.=n-1}^2$$

Verificato che per ciascuna serie i dati, ottenuti sperimentalmente, sono compatibili con il modello statistico di Poisson, le prestazioni dei due metodi (A e B) sono verificate utilizzando la seguente espressione:

$$(12) \quad \frac{|\bar{C}_A - \bar{C}_B|}{\sqrt{\frac{\bar{C}_A}{n_A} + \frac{\bar{C}_B}{n_B}}} \leq k_p$$

\bar{C}_A = media dei valori ottenuti con il metodo di riferimento
 \bar{C}_B = media dei valori ottenuti con il metodo da validare
 n_A e n_B = numero delle repliche (possibilmente identiche effettuate con metodo A e B)
 K_p = 1,96 per $p=0,95$ ($p=95\%$)

Nel caso che la relazione sia soddisfatta, i due metodi forniscono risultati non significativamente diversi ad un livello di probabilità pari a p del 95%, corrispondente al fattore di copertura $k_p=1,96$ e quindi sono considerati equivalenti.

4.1.2.2.2 Validazione di un metodo con la partecipazione ad un circuito interlaboratorio

I risultati ottenuti con il metodo in esame sono confrontati con i risultati ottenuti a seguito di partecipazione ad un circuito interlaboratorio qualificato.

I risultati ottenuti sono valutati utilizzando l'elaborazione fatta dal circuito interlaboratorio e sono adottati i criteri di accettabilità proposti dallo stesso.

Nel caso che il circuito interlaboratorio renda noto "il valore vero" della contaminazione del microrganismo target e lo scarto tipo ad esso collegato, è verificato che il metodo in sperimentazione fornisce risultati accettabili mediante la seguente formula:

$$(13) \quad \frac{|\bar{C} - \mu|}{\sqrt{\frac{\bar{C}}{n} + S_\mu^2}} \leq K_p$$

\bar{C} = media dei valori ottenuti con il metodo in sperimentazione
 μ = valore vero
 S_μ = scarto tipo associato al valore vero
 n = numero di repliche sul campione ottenute con il metodo in sperimentazione
 K_p = 1,96 per $p=0,95$ ($p=95\%$)

4.1.2.2.3 Validazione di un metodo con utilizzo di un materiale di riferimento certificato (MRC)

In microbiologica i materiali di riferimento certificati (MRC), rappresentativi di matrici alimentari, sono contaminati con un determinato microrganismo la cui concentrazione (valore medio e relativa incertezza espressa come intervallo di fiducia al 95 %) è determinata da una serie di laboratori selezionata e certificata in un documento che riporta il numero dei microrganismi determinati in un volume di $1 \pm 0,02$ mL, prelevato da 10 mL di soluzione fisiologica peptonata (T 42), nella quale è ricostituito il MRC.

Quando si dispone di un idoneo materiale di riferimento a valore e incertezza noti, una volta verificata e valutata la compatibilità con lo scopo e il campo di applicazione del metodo da validare, sono eseguite con lo stesso una serie di prove replicate.

Verificato che la dispersione dei dati è coerente con la distribuzione di Poisson, è praticato il confronto tra il risultato medio ottenuto sperimentalmente e il valore del materiale certificato dal produttore, applicando la formula (13).

Esempio:

MRC (BCR 506 *Enterococcus faecium* in capsule di gelatina) ricostituito con BPW (T 42) secondo le istruzioni fornite dal produttore IRMM, analizzato con metodo ISO 7899/2000 e terreno m-EA Slanetz e Bartley (T 100) (membrane filtranti): valore medio 72 UFC/piastra, intervallo di fiducia al 95% (estremi 63 – 82 UFC/piastra).

Valore medio di riferimento di 1 mL della soluzione ricostituita (volume totale 10 mL) pari a:

$$\mu = 72 \pm 10 \text{ UFC}$$

Il valore 10 rappresenta l'incertezza, espressa come l'intervallo di fiducia al 95% e calcolata come:

$$IF = 1,96 \times S_{\mu} \text{ quindi è ricavato lo scarto tipo } S_{\mu} = \frac{IF}{1,96} = \frac{10}{1,96} = 5,1 \text{ UFC/mL del MRC}$$

Da una sospensione di 10 mL ricostituita sono effettuati 9 prelievi da 1 mL ciascuno, successivamente filtrati con membrane da 45 μ . Le membrane sono depositate sulle piastre di terreno

m-EA Slanetz e Bartley (T 100), e le piastre incubate a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 44 ± 4 ore.

N. piastra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Conteggio UFC/piastra	75	70	73	68	80	74	77	81	78

Prima di confrontare la media dei valori ottenuti con il valore di riferimento, è verificato che la dispersione dei dati registrati sia coerente con il modello di distribuzione di Poisson mediante la formula (13).

Ciò avviene applicando il test del chi-quadrato ad un livello di probabilità del 95 % ($p=0,95$ vedi formula (11) e, nel caso di eccessiva dispersione, anche verificando l'eventuale presenza, nella serie dei dati ottenuti, di risultati "anomali" mediante il test di Huber o test robusto della mediana.

I risultati della valutazione effettuata sui dati esemplificati sopra sono riepilogati di seguito:

Numero repliche = 9		Gradi di libertà ($\nu = n-1$) = 8	
χ^2_{tab} tabulato ($p=0,95$ e $\nu=8$)	15,507	Verifica dispersione serie dati ($2,036 < 15,507$) $\chi^2_{sp} < \chi^2_{tab}$ Accettabile	
χ^2_{sp} sperimentale ($p=0,95$)	2,036		
Media conteggio	75,0	Media conteggio calcolato	75,1
Incertezza (espressa come intervallo di fiducia al 95%)		$IF = \pm 1,96 \sqrt{\frac{\bar{C}}{n}}$	
Risultato finale (media) = 75 ± 6 UFC/mL			

4.1.2.2.4 Verifica dell'accuratezza della prestazione del metodo

Il confronto tra la media dei conteggi sperimentali ottenuti con il metodo in esame e il valore del materiale di riferimento certificato è effettuato applicando la formula (13) e calcolando il k_p sperimentale. Il criterio di valutazione della prestazione del metodo è associato al risultato ottenuto come segue:

a) $K_p \text{ sperimentale} \leq K_p \text{ tabulato (p=0,95)}$ **1,96 Metodo accurato**

b) $K_p \text{ sperimentale} > K_p \text{ tabulato (p=0,95)}$ **1,96 Metodo non accurato - valutare**

Nel caso esemplificato:

$$k_{p\ sp} = \frac{|75,1 - 72|}{\sqrt{\frac{75,1}{9} + 5,1^2}} = \frac{3,1}{\sqrt{34,3}} = \frac{3,1}{5,8} = 0,53$$

risultato: 0,53 < 1,96 Metodo accurato

4.1.2.2.5 Validazione mediante analisi della sovradisersione dei dati osservati sperimentalmente (verifica del grado di accordo con il modello)

L'esecuzione di una prova comporta la comparsa di errori (modalità di preparazione del campione, misure di volumi e/o masse, temperature di incubazioni, errori di lettura etc.).

La somma di tutti gli errori determina una certa dispersione dei risultati definita **sovradisersione**, che si somma alla dispersione casuale dei dati stimati con Poisson.

Un metodo microbiologico quantitativo è considerato idoneo all'uso quando la sovradisersione determinata dal metodo stesso non modifica significativamente la dispersione dei conteggi stimata applicando la distribuzione di probabilità di Poisson, presa a riferimento teorico.

Poiché risulta difficoltoso determinare quantitativamente il contributo di singoli fattori alla variabilità complessiva, l'analisi statistica di seguito descritta è finalizzata alla valutazione preventiva dell'accettabilità della dispersione sperimentale, complessivamente intesa, applicata ai dati dei conteggi prima di esprimere il risultato finale.

Le espressioni utilizzate per verificare il grado di accordo con il modello teorico della dispersione sperimentale dei dati sono di seguito riportate

$$G_{n-1}^2 = 2 \times \left[\sum (c_i \times \ln c_i) - \left(\sum c_i \right) \times \ln \left(\frac{\sum c_i}{n} \right) \right] \quad (14)$$

$$\chi_{n-1}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{C})^2}{\bar{C}} \quad (15)$$

$$\chi_{n-1}^2 = \frac{n \times \sum c_i^2}{\sum c_i} - \sum c_i \quad (16)$$

n = numero delle osservazioni

c_i = valore delle singole osservazioni

Le espressioni (15) e (16) sono equivalenti e rappresentano un'approssimazione della (14).

La distribuzione dei dati sperimentali è considerata accettabile quando il valore sperimentale stimato, applicando una delle suddette formule, risulta inferiore al valore del chi-quadrato tabulato di riferimento.

\bar{C} = media aritmetica delle osservazioni c_i

$$(G_{n-1}^2 \approx \chi_{n-1}^2) \leq \chi_{(g.l.=n-1)}^2 \text{ con } p \geq 0,95 \quad (17)$$

4.1.2.2.6 Pianificazione della validazione di metodi microbiologici mediante l'analisi della sovradisersione

La pianificazione del processo di validazione di un metodo microbiologico attraverso l'analisi della sovradisersione si basa sull'esame dei risultati ottenuti su più repliche (almeno 2 o 3) dello stesso campione. Le modalità di inoculo previste dalla ISO 7218 possono essere utilmente utilizzate.

Una simile procedura minimizza al massimo gli errori casuali di semina e di incubazione, riducendo al minimo i fattori esterni al metodo in grado di influenzare il risultato finale.

Il processo analitico in fase di validazione dovrebbe prevedere, quando possibile, l'inoculo di diluizioni scalari del campione.

La procedura ISO 7218 permette anche di valutare la linearità del metodo.

4.1.2.2.7 Verifica del grado di accordo dei risultati sperimentali con il modello di distribuzione teorica

Verifica effettuata utilizzando l'espressione (14), valutazione dei risultati effettuata utilizzando l'espressione (17).

Esempio: dati relativi allo studio della dispersione di un metodo microbiologico riferiti a prove su matrici diverse e in tempi diversi.

Prova	1°	2°	G ²	Prova	1°	2°	G ²
1	40	35	0,333581	22	300	286	0,334503
2	30	28	0,068979	23	120	118	0,016807
3	302	295	0,082079	24	110	105	0,11629
4	80	71	0,536742	25	195	186	0,212618
5	166	152	0,616551	26	35	33	0,058832
6	48	36	1,720165	27	188	180	0,173927
7	42	33	1,082607	28	320	290	1,476005
8	38	36	0,054061	29	190	172	0,895397
9	300	265	2,16953	30	280	268	0,262795
10	110	100	0,476371	31	76	66	0,704809
11	54	50	0,153884	32	192	180	0,387164
12	203	190	0,430104	33	60	52	0,571915
13	296	280	0,444502	34	300	280	0,689792
14	280	270	0,181828	35	40	34	0,487021
15	180	172	0,181834	36	120	110	0,43492
16	161	158	0,028214	37	137	133	0,059261
17	90	85	0,142877	38	30	29	0,01695
18	55	50	0,238185	39	91	80	0,708091
19	46	40	0,418945	40	172	164	0,190494
20	60	52	0,571915	41	150	140	0,344896
21	300	286	0,334503	Totale			18,44025

$$G_{tot}^2 = 18,440$$

4.1.2.3 Criteri di valutazione

- I dati delle singole prove sopra riportate è accettabile se i valori del G² (sperimentale) sono inferiori al χ^2 tabulato al livello di probabilità del 95% e per gradi di libertà (g.l.) = (numero repliche - 1).
- La dispersione dei dati osservata tra le singole repliche di prove indipendenti può essere valutata con la sommatoria dei singoli G².

$$G_{tot}^2 = \sum_{i=1}^n G_i^2$$

La dispersione dei conteggi tra prove indipendenti comprendenti lo stesso numero di repliche è accettabile quando:

$$G_{tot}^2 \leq \chi^2 \text{ con g.l.} = (\text{numero di prove} - 1).$$

Nel caso che si verificano le condizioni a) e b) si può concludere che il metodo è idoneo perché non modifica la naturale dispersione dei dati presente nella distribuzione di Poisson.

4.1.3 Linearità (proporzionalità delle diluizioni)

Considerate piastre con un numero di UFC compreso tra 10 e 300

$$G_{m-1}^2 = 2 \times \left[\sum_{i=1}^m \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m c_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right] \quad (18)$$

C_i = numero di UFC rilevate nella piastra

R_i = quantità di campione inoculata nella diluizione in esame

Esempio:

Diluizioni esaminate	Volumi relativi (R_i)	UFC rilevate in piastra (c_i)
10^{-3}	10	181
10^{-4}	1	20

$$\text{Da cui: } G_{m-1}^2 = 2 \times \left[181 \times \ln \left(\frac{181}{10} \right) + 20 \times \ln \left(\frac{20}{1} \right) - (181 + 20) \times \ln \left(\frac{181 + 20}{10 + 1} \right) \right] = 0,349$$

4.1.3.1 Valutazione della linearità (proporzionalità delle diluizioni)

Un metodo fornisce risultati lineari se la seguente espressione risulta soddisfatta:

$$G_{m-1}^2 \leq \chi_{g.l}^2 \quad \text{con g.l.} = \text{numero diluizioni esaminate} - 1$$

χ^2 tabulato al livello di probabilità del 95% e gradi di libertà = (numero diluizioni esaminate -1)

4.1.4 Determinazione dei parametri sensibilità specificità – efficienza - selettività del metodo

Al termine del processo di prova le colonie considerate positive e quelle considerate negative (non conteggiate) sono verificate con ulteriori mezzi diagnostici (test biochimici, sierologici etc.).

In base ai risultati ottenuti nelle prove di conferma, è possibile costruire la seguente tabella (UNI ENV ISO 13843:2003 al punto 9.2):

UFC Confermate	Conta presunta Positivi (+)	Negativi (-)	Somma
Positivi (+)	a	b	a + b
Negativi (-)	c	d	c + d
Somma	a + c	b + d	n
n = a+b+c+d			

a = n. di presunti positivi trovati positivi (veri positivi)

b = n. di presunti negativi trovati positivi (falsi negativi)

c = n. dei presunti positivi trovati negativi (falsi positivi)

d = n. dei presunti negativi trovati negativi (veri negativi)

4.1.4.1 Calcoli

Sulla base dei risultati sopra riportati sono definiti i seguenti parametri statistici

Formule di calcolo e interpretazione	Formule di calcolo e interpretazione
$\text{Sensibilità} = \frac{a}{a+b}$ Frazione dei positivi totali correttamente assegnata nella conta presuntiva	$\text{Specificità} = \frac{d}{c+d}$ Frazione dei negativi totali correttamente assegnata nella conta presuntiva
$\frac{c}{a+c}$ tasso dei falsi positivi: frazione dei positivi erroneamente assegnata	$\frac{b}{b+d}$ tasso dei falsi negativi frazione dei negativi erroneamente assegnata
n = a + b + c + d numero totale delle prove	
$\text{Efficienza (E)} = \frac{a+d}{n}$ frazione di UFC o provette correttamente assegnate a = veri pos. d = veri neg.	$\text{Selettività} = \text{Log} \frac{(a+c)}{n}$ Log decimale della frazione di UFC di riferimento presunte (presunti pos.) del tot.

4.1.4.2 Valutazione dei risultati

I risultati possono essere valutati rispetto a dei parametri fissati arbitrariamente dal laboratorio.

Il laboratorio considera accettabile un metodo se (vedi UNI ENV ISO 13843 :2003, punto 8):

Sensibilità > 0,90	Specificità > 0,90	Efficienza > 0,90
Selettività – limite superiore della linearità (colonie di riferimento per piastra)		
100 a 25 UFC Accettabile da -1 a -2 Inaccettabile >-1 e <-2	200 a 100 UFC Accettabile da -0,5 a -1 Inaccettabile >-0,5 e <-1)	

4.1.5 Validazione secondaria

I risultati ottenuti in ogni prova microbiologica devono essere sottoposti ad analisi al fine di verificare la loro dispersione e la conformità al modello teorico (validazione secondaria). Il modello teorico utilizzato è quello che fa riferimento all'analisi della sovradisersione. Di seguito sono descritti tre modelli operativi con cui effettuare la validazione secondaria di un metodo di prova:

- Metodo 1 – UNI 10674:2002
- Metodo 2 - ISO 14461-1/IDF 169-1:2005 e ISO 14461-2/IDF 169-2:2005
- Metodo 3 – UNI EN ISO 4833:2004

La condizione indispensabile per procedere alla validazione secondaria dei risultati è che siano eseguite più repliche per inoculo o siano inoculate quantità scalari di campione (ISO 7218)

4.1.5.1 Metodo 1 : UNI 10674:2002

Riferimenti e formule = UNI 10674:2002 (vedi nota uso titolo norme) e ISO 7218.

- a) valutazione della dispersione dei risultati ottenuti nelle repliche della stessa (conta >15 UFC/piastra),
Calcolo di K_p sperimentale:

b)

$$k_p = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{(C_1 + C_2)}} \quad (19)$$

C_1 e C_2 = valore dei conteggi nelle due repliche

b) Criteri di valutazione del K_p

$K_p \leq 1,96 \approx 2,0$ dispersione dei conteggi accettabile
 $2,0 > K_p \leq 2,576 \approx 2,6$ dispersione dei conteggi critica. Approfondire
 $K_p > 2,6$ dispersione dei conteggi inaccettabile

- c) valutazione della linearità (proporzionalità) dei risultati in diluizioni a scalari è fatta con il del G^2 , utilizzando la formula (18).

Criteri di valutazione della validazione secondaria metodo 1

I risultati sono attendibili se la dispersione di Poisson e la linearità (proporzionalità delle diluiz.) sono statisticamente accettabili.

Esempio: valutazione della dispersione conteggi rientranti nel range 15 – 300UFC/piastra con diametro circa 9 – 100 mm, inoculo 1 mL

Diluizione	Conta piastra C1	Conta piastra C2	K_p sperimentale
10^{-3}	181	215	1,71
10^{-4}	20	25	0,75

La dispersione (K_p) delle prove è inferiore al valore tabulato, $K_p = 1,96$ per $p=95\%$, è quindi accettabile.

Valutazione della linearità

$$G_1^2 = 2 \times \left[\sum C_1 \ln \frac{\sum C_1}{R_1} + \sum C_2 \ln \frac{\sum C_2}{R_2} - (\sum C) \ln \frac{\sum C}{\sum R} \right] \quad (C=C_1+C_2 ; R=R_1+R_2)$$

$$G_1^2 = 2 \times \left[\begin{array}{l} (181+215) \ln \frac{181+215}{10} + (20+25) \ln \frac{20+25}{1} - \\ (181+215+20+25) \ln \frac{181+215+20+25}{10+1} \end{array} \right] = \mathbf{0,638}$$

Per 1 grado di libertà (due successivi livelli di diluizione presi in esame), $p=95\%$ $\chi_{\text{tab}}^2 = 3,841$ quindi:

$$G_1^2 \leq \chi_{\text{tab}}^2 \quad (0,638 < 3,841) \text{ è "accettabile".}$$

La valutazione statistica della dispersione e della linearità effettuata sui dati sperimentali ottenuti dalla prova dimostra che sono coerenti con il modello proposto e quindi "accettabili".

4.1.5.2 Metodo 2 :ISO 14461/IDF 169:2005

La norma IDF/FIL 169:1994, sostituita dalla ISO 14461-1 e 2/IDF 169-1 e 2 (*Milk and products – Quality control in microbiological laboratories – Parte 1 e Parte 2*) e nella ISO 7218:1996 è descritto un metodo di valutazione statistica fondato sulla stima del G^2

Valutazione della dispersione totale:

$$G_{TOT-1}^2 = 2 \times \left[\sum C_i \ln \frac{C_i}{R_i} - (\sum C_i) \ln \left(\frac{\sum C_i}{\sum R_i} \right) \right] \quad (20)$$

Gradi di libertà $v = n$ totale piastre -1

Indice di dispersione tra piastre replicate allo stesso livello di diluizione

$$G_{Li-1}^2 = 2 \times \left[\sum c_j \times \ln c_j - (\sum c_j) \times \ln \left(\frac{\sum c_j}{n} \right) \right] \quad (21)$$

Gradi di libertà $v = n$ totale piastre -1

Indice di dispersione tra piastre replicate ai vari livelli di diluizione (linearità)

$$G_{m-1}^2 = 2 \times \left[\sum_{i=1}^m \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m c_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right] \quad (22)$$

$$G_{TOT-1}^2 = G_{L_{i-1}}^2 + G_{m-1}^2 \quad (23)$$

Diluizione 10^{-3}	40 UFC	35 UFC
Diluizione 10^{-4}	5 UFC	3 UFC

Gradi di libertà $v = n$ totale piastre -1

Esempio: (inoculo 1 mL)

Valutazione della dispersione totale dei conteggi formula (20)

$$G_{TOT-1}^2 = 2 \times \left[40 \ln \left(\frac{40}{10} \right) + 35 \ln \left(\frac{35}{10} \right) + 5 \ln \left(\frac{5}{1} \right) + 3 \ln \left(\frac{3}{1} \right) - (40 + 35 + 5 + 3) \ln \left(\frac{40 + 35 + 5 + 3}{10 + 10 + 1 + 1} \right) \right] = 0,868516$$

Contributo al G_{TOT}^2 dovuto alle repliche dei singoli inoculi (formula 21)

$$(\text{diluiz. } 10^{-3}) G_{LA-1}^2 = 2 \times \left[40 \ln(40) + 35 \ln(35) - (40 + 35) \ln \left(\frac{40 + 35}{2} \right) \right] = 0,333581$$

$$(\text{diluiz. } 10^{-4}) G_{LB-1}^2 = \left[5 \ln(5) + 3 \ln(3) - (5 + 3) \ln \left(\frac{5 + 3}{2} \right) \right] = 0,0505343$$

Contributo al G_{TOT}^2 dovuto alla preparazione delle diluizioni (proporzionalità) (formula 22)

$$G_{m-1}^2 = 2 \times \left[(40 + 35) \ln \left(\frac{40 + 35}{10} \right) + (5 + 3) \ln \left(\frac{5 + 3}{1} \right) - (45 + 35 + 5 + 3) \times \ln \left(\frac{45 + 35 + 5 + 3}{10 + 1} \right) \right] = 0,029592$$

Dispersione totale (formula 23) $G_{TOT-1}^2 = G_{LA-1}^2 + G_{LB-1}^2 + G_{m-1}^2$
 $(0,868516 = 0,333581 + 0,0505343 + 0,029592)$

4.1.5.2.1 Valori critici della dispersione del χ^2

Gradi libertà	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$p=0,95$	3,841	5,991	7,815	9,488	11,070	12,562	14,067	15,507	16,916	18,307	19,675	21,026	22,362	23,685	24,996
$p=0,99$	6,635	9,210	11,345	13,277	15,086	16,812	18,475	20,090	21,666	23,209	24,725	26,217	27,688	29,141	30,578

Per livelli di probabilità del 95% ($p=0,95$) e 99% ($p=0,99$) per gradi di libertà da 1 a 15. Fonte “Tavole Scientifiche Geigy” ottava edizione, 2° volume, 1984, pag.34.

Se la dispersione totale è “accettabile”, ovvero coerente con il modello sperimentale, anche le dispersioni per livello e tra livelli, in genere, sono coerenti.

Se, invece, la dispersione totale “non è accettabile” è possibile verificare, eventualmente, se la causa è da ricercare nelle componenti di dispersione considerate o per altre cause da indagare.

4.1.5.3 Metodo 3 :UNI EN ISO 4833:2004

La norma specifica un metodo orizzontale per la conta di microrganismi nei prodotti destinati all'alimentazione umana e a quella animale (CBT) con la tecnica della conta delle colonie sviluppatesi in terreno solido dopo incubazione a 30 °C in aerobiosi, riporta i dati di precisione valutati per piastre con un numero di UFC compreso tra 15 e 300.

La norma riporta i valori del limite di ripetibilità ($r = 0,25$) e del limite di riproducibilità ($R=0,45$) derivati da studi interlaboratorio espressi in \log_{10} microrganismi per millilitro ad un livello di probabilità del 95% stimati sui valori finali dei conteggi, tenendo quinti conto del fattore di diluizione del campione.

I limiti di ripetibilità e riproducibilità, presi a riferimento al momento dell'emissione della norma, sono derivati da studi interlaboratorio effettuati su latte fresco e pastorizzato. Pertanto essi possono essere utilizzati come una stima indicativa quando sono le conte delle colonie sono determinate in altri prodotti. A tale proposito è opportuno considerare tali limiti in ragione ai dati sperimentali ottenuti dal laboratorio in applicazione alla ISO/TS 19036:2006.

4.1.5.3.1 Valutazione dei risultati di prova

a) Condizioni di ripetibilità del laboratorio

La differenza tra i due conteggi finali replicati in condizioni di ripetibilità, espressi in \log_{10} , è accettabile, al 95%, se è inferiore o uguale a 0,25 unità \log_{10} .

$$r = |\log_{10} A_1 - \log_{10} A_2| \leq 0,25$$

Di seguito è riportato un esempio relativo a una serie di conteggi replicati su piastra, valutando la differenza assoluta tra due risultati di prove singole indipendenti, ottenute utilizzando lo stesso metodo, sullo stesso campione di prova, nello stesso laboratorio dallo stesso operatore utilizzando la stessa attrezzatura entro un breve intervallo di tempo.

- 1) $A_1 = 100 - A_2 = 175$, diluizione 10^{-3} , volume inoculato 1mL
- 2) $A_1 = 100 - A_2 = 52$, diluizione 10^{-3} , volume inoculato 1mL
- 3) $A_1 = 43 - A_2 = 66$, diluizione 10^{-4} , volume inoculato 1mL
- 4) $A_1 = 89 - A_2 = 65$, diluizione 10^{-2} , volume inoculato 1 mL

	Conteggio UFC/mL		Conteggio (log ₁₀)		Ripetibilità (log ₁₀)		
	A ₁	A ₂	log ₁₀ A ₁	log ₁₀ A ₂	Calcolata	Metodo r=0,25	
					$r = \log_{10} A_1 - \log_{10} A_2 $	Accett. ≤ 0,25	Non Accett. > 0,25
Caso 1	100.000	175.000	5,00	5,24	0,24	*	
Caso 2	100.000	52.000	5,00	4,72	0,28		*
Caso 3	430.000	660.000	5,63	5,82	0,19	*	
Caso 4	8.900	6.500	3,95	3,81	0,14	*	

Nei casi 1-3-4, la differenza tra il primo ed il secondo risultato non supera il valore di 0,25 unità log₁₀ e quindi è accettabile ed i valori possono essere mediati. Nel caso 2 la differenza tra i risultati supera il valore di 0,25 e quindi non è accettabile.

b) Condizioni di riproducibilità

Confronto del conteggio di microrganismi ottenuto con due repliche sullo stesso campione da due diversi laboratori (L_A e L_B);

(verificare prima che i risultati forniti da entrambi i laboratori rispettino le condizioni di ripetibilità, sulla base di quanto riportato al punto a)

Esempio:

	Conteggio UFC /mL		Conteggio (log ₁₀)		Reperibilità r (log ₁₀)	Media (UFC/mL)
	A ₁	A ₂	log ₁₀ A ₁	log ₁₀ A ₂		
Laboratorio L _A	80.000	120.000	4,90	5,08	0,18 (accettabile)	100.000
Laboratorio L _B	62.000	88.000	4,79	4,94	0,15 (accettabile)	75.000

Valutazione della differenza dei risultati (in scala log₁₀) tra due laboratori al 95% - limite riproducibilità R=0,45 log₁₀

Conta (UFC /mL) 2		Conteggio (log ₁₀)		Riproducibilità (log ₁₀)		
Lab. L _A	Lab. L _B	log ₁₀ L _A	log ₁₀ L _B	Calcolata R=	log ₁₀ L _A - log ₁₀	Metodo R = 0,45
100.000	75.000	5,00	4,88	0,12		≤ 0,45 >0,45non

La differenza tra i risultati medi ottenuti dal primo (L_A) e dal secondo laboratorio (L_B) rispetta le condizioni di riproducibilità indicate dal metodo, quindi, è accettabile.

4.2 Incertezza del risultato analitico microbiologico

Nelle prove microbiologiche la variabilità dei fattori non sempre consente una stima rigorosa dell'incertezza di misura come stabilito dalla UNI CEI ENV 13005:2000; questi casi sono considerati nella UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 p.to5.4.6.2., ed il concetto è ulteriormente ribadito dalla linea guida EA-04/10 rev.02 p.to5.2 Di seguito sono riportati indicazioni ed esempi relativi ai criteri e alle modalità da adottare per stimare l'incertezza di misura da associare ai risultati di prove quantitative.

Il Laboratorio può decidere, se non altrimenti specificato dal metodo o in altri documenti a carattere cogente, di stimare l'incertezza di misura come intervallo di fiducia calcolato applicando uno dei seguenti criteri:

1. Incertezza (intervallo di fiducia) stimata sulla base della distribuzione di Poisson (campo di misura 1-10 UFC/piastra)
2. Incertezza (intervallo di fiducia) stimata sulla base della distribuzione di Poisson approssimata alla normale (campo di misura 15-300 UFC/piastra)
3. Intervallo di fiducia stimato con le formule riportate nella ISO 7218:1996
4. Incertezza nei prodotti destinati al consumo umano ed animale e nei campioni ambientali secondo la ISO/TS 19036:2006 + ISO 19036:2006/Amd 1:2009
5. Incertezza nelle acque secondo la ISO 8199:2005

4.2.1 Incertezza (intervallo di fiducia) stimata sulla base della distribuzione di Poisson (campo di misura 1 – 10 UFC/piastra)

4.2.1.1 Conteggio e stima dell'intervallo di fiducia a seguito della semina su piastra di un campione con esecuzione di n.1 prova singola.

Il risultato è ottenuto applicando la tabella di Poisson (vedi tabella n.2 al capitolo Tabelle)

Matrice	N. piaste inoculate	Conteggio (UFC/piastra)	Intervallo di fiducia al		Intervallo di fiducia al	
			Inferiore	Superiore	Inferiore	Superiore
A	1	3	< 1	7	< 1	9
B	1	5	2	12	1	14
C	1	7	3	14	2	17
D	1	14	8	24	6	27

a) campioni liquidi: se i dati riportati provengono da prove microbiologiche eseguite su campioni liquidi analizzati tal quale, il risultato numerico del conteggio ed i limiti dell'intervallo di fiducia rappresentano rispettivamente la "concentrazione" e "l'incertezza di misura", per mL, dei microrganismi nel campione di prova da riportare nel Rapporto di Prova. Se nella piastra seminata non viene evidenziata la crescita di alcuna colonia, nel Rapporto di Prova esprimere si esprime il risultato come <1 UFC/mL, senza indicare i limiti dell'intervallo di fiducia, ipotizzando che il valore di 1 UFC rappresenti il limite di rivelabilità di conteggio in un mezzo culturale solido.

b) campioni solidi: se i dati riportati provengono da prove microbiologiche eseguite su campioni solidi dei quali, necessariamente, prima della semina, è stata predisposta una sospensione iniziale, occorre tenere conto del fattore di diluizione riferito a tale sospensione, nell'esprimere il risultato finale.

Esempio: piastre inoculate 1; diluizione 1/10; numero UFC $7 = N_E = \frac{N}{d} = \frac{7}{0,1} = 70UFC / g$

Intervallo di fiducia al 95% Limite inf. $\frac{3}{d} = \frac{3}{0,1} = 30UFC / g$ Limite sup. $\frac{14}{d} = 140UFC / g$

Conteggio e stima dell'intervallo di fiducia a seguito della semina su piastra di un campione con esecuzione di n.2 prove:

Esempio: piastre seminate: 2; volume seminato 1 mL; somma tot. dei singoli 2 conteggi non > a 20 UFC/piastra

N. piastre inoculate	Conteggio (UFC/piastra)		Somma (UFC/piastra)	Intervallo di fiducia al 95% e			Intervallo di fiducia al	
	I	II		Inferiore	Superiore	Media	Inferiore	Superiore
2	8	10	18	11	28	9	5	14

Valutazione della dispersione e accettabilità dei singoli conteggi su piastra per poter essere “sommati”

Esempio 1:

N. piastre inoculate	Conteggio (UFC/piastra)		Somma(UFC/piastra)	Media e Intervallo di fiducia al			Risultato verifica
	I	II		Media	Inferiore	Superiore	
2	6	10	16	8	5	13	Accettabile
2	4*	12	16	8	5	13	Non accettabile

*Il conteggio di 4 UFC/piastra è esterno al limite inferiore dell'intervallo di fiducia al 95% (5 UFC/piastra) tabulato

Esempio 2:

N. piastre inoculate	Conteggio UFC/piastra					Somma UFC/piastra	Intervallo di fiducia al 95%		Media Conta	Intervallo di fiducia al 99%	
	I	II	III	IV	V		Inferiore	Superiore		Inferiore	Superiore
5	6	9	5	2	8	30	20	43	6	4	9

Il conteggio di 2 UFC/piastra è esterno al limite dell'intervallo di fiducia al 95% (4 UFC/piastra) tabulato

4.2.1.2 Incertezza (intervallo di fiducia) stimata sulla base della distribuzione di Poisson approssimata alla normale (15 – 300 UFC/piastra)

Quando il conteggio è ≥ 15 UFC/piastra il modello di distribuzione probabilistica delle “particelle” di Poisson è approssimabile alla distribuzione normale o di Gauss.

L’incertezza in questo caso è espressa come intervallo di fiducia applicando il fattore di copertura $k_p = 1,96 (\approx 2)$ nel quale hanno probabilità di cadere il 95% ($p=0,95$) dei risultati ($p=0,95\%$) con il rischio che il 5% ($\alpha=0,05$) dei risultati cadano fuori di questo intervallo.

I limiti inferiore e superiore di questo intervallo statistico risultano equidistanti dal valore medio e sono calcolati, per conteggi su piastra ricadenti nell’intervallo 15-300 UFC/piastra, applicando la seguente formula:

$$(24) \quad \bar{C} \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{\bar{C}}{n}} \quad \text{Limite superiore} \rightarrow \bar{C} + 1,96 \times \sqrt{\frac{\bar{C}}{n}} \quad \text{Limite inferiore} \rightarrow \bar{C} - 1,96 \times \sqrt{\frac{\bar{C}}{n}}$$

\bar{C} = Media conteggio UFC/piastra n = numero di repliche sullo stesso campione

Esempio:

Caso	Conteggio UFC/mL		K_p calcolato	Valutazione risultato	Risultato (UFC/piastra)	
	C_1	C_2			Media	Incertezza stimata (IF) $p=0,95$
1	60	75	1,29 (<1,96)	Accettabile	68	± 11
2	32	54	2,37 (>1,96; <2,58)	Critico-valutare	43	
3	48	84	3,13 (>2,58)	Anomalo	66	

La stima dell’incertezza IF da associare alla media dei conteggi \bar{C} per il caso 1 è “accettabile”, per $n = 2$ prove, è la seguente:

$$IF = \bar{C} \pm 1,96 \sqrt{\frac{\bar{C}}{n}} = 68 \pm 1,96 \sqrt{\frac{68}{2}} = 68 \pm 11 \text{ UFC/ piastra}$$

Limite inferiore $68 - 11 = 57$ UFC/piastra Limite superiore $68 + 11 = 79$ UFC/piastra

Espressione del risultato

Il n. dei microrganismi (N) e intervallo di fiducia (IF) sono calcolati con le formule (25) e (26)

$$(25) \quad N = \frac{\bar{C}}{V \times d} \quad IF = \left(\bar{C} \pm 1,96 \sqrt{\frac{\bar{C}}{n}} \right) \times \frac{1}{V \times d} \quad (26)$$

V = volume inoculo in mL per piastra
 d = fattore di diluizione
 n = numero di prove replicate nel campione

4.2.1.3 Conteggio e intervallo di fiducia con formula riportata nella ISO 7218:2007

Il conteggio e la stima dell’intervallo di fiducia sono effettuati mediante l’applicazione della norma ISO 7218 dopo aver verificato la congruità dei risultati ai criteri statistici definiti nella parte relativa alla validazione secondaria.

Il numero dei microrganismi rilevati su due piastre a livelli di diluizioni successive (campo di misura 15 – 300 UFC/piastra) è ottenuto mediante la formula:

$$N = \frac{\sum C_i}{v(n_1 + 0,1n_2)d} \quad \text{ponendo } B = v(n_1 + 0,1n_2)d \quad \longrightarrow \quad N = \frac{\sum C_i}{B} \quad (25)$$

ΣC_i = somma delle UFC contate su tutte le piastre di tutte le diluiz.

n_1 = numero piastre inoculate con la prima diluizione

d = fattore di diluizione

V = volume di inoculo per piastra in mL di cui almeno una contiene 15 colonie

n_2 = numero piastre inoculate con la seconda diluizione

L'intervallo di fiducia al 95% (δ) è ottenuto mediante la formula (26):

$$\delta = \left[\frac{\sum C}{B} + \frac{1,92}{B} \pm \frac{1,96\sqrt{\sum C}}{B} \right] \frac{1}{d} \quad (26)$$

$$\delta_L = \left[\frac{\sum C}{B} + \frac{1,92}{B} - \frac{1,96\sqrt{\sum C}}{B} \right] \frac{1}{d} \quad \text{Limite infer.}$$

$$\delta_U = \left[\frac{\sum C}{B} + \frac{1,92}{B} + \frac{1,96\sqrt{\sum C}}{B} \right] \frac{1}{d} \quad \text{Limite super.}$$

A seguito dell'emissione della norma ISO/TS 19036:2006, l'intervallo di fiducia così calcolato e richiamato nella ISO 7218:1996 non può più essere utilizzato per la stima dell'incertezza di misura. Infatti con l'emissione della ISO 7218:2007 l'incertezza deve essere stimata ed espressa sulla base di quanto riportato nel successivo punto. La stima dell'intervallo di fiducia, applicando le formule sopra riportate, può essere comunque un utile riferimento - in particolare in fase di studio e applicazione del metodo - per valutare analogie e diversità tra questo intervallo statistico/teorico sulla base del modello di dispersione di Poisson e quello ottenuto con l'approccio globale della ISO/TS 19036:2006 e ISO/TS 19036 AMD/1:2009.

Esempio:

Diluizioni	ConteggioUFC/piastra		K _p calcolato	Risultato	Risultato linearità
	C ₁	C ₂		K _p ≤ 1,96 p=0,95	G ² _{n-1} ≤ χ ² _{tabulato}
10 ⁻²	260	238	0,99	Accettabile	Accettabile
10 ⁻³	33	30	0,38	Accettabile	

Verifica linearità (proporzionalità)

$$G_{n-1}^2 = G_{2-1}^2 = G_1^2 = 2 \times \left[498 \ln \left(\frac{498}{10} \right) + 63 \ln \left(\frac{63}{1} \right) - 561 \ln \left(\frac{561}{11} \right) \right] = 2,910$$

Dalla tabella del χ^2 per $v=1$ e $p=0,95$, si ricava che il valore di 3,841.

Il valore del G_{n-1}^2 calcolato è inferiore a quello tabulato e quindi i conteggi sono tra di loro congruenti, l'operatore ha eseguito correttamente la diluizione indicata dal metodo.

Calcolo del N di microrganismi applicando la formula (27)

$$N = \frac{260 + 238 + 33 + 30}{1(2 + 0,1 \times 2)} \times \frac{1}{10^{-2}} = \frac{561}{0,022} = 25.500 \text{ UFC/g (mL) prodotto}$$

Esprimere il risultato con due cifre $N = 2,6 \times 10^4$ UFC/piastra

Calcolo dell'intervallo di fiducia al 95% applicando la formula (28)

$$\delta = \left[\frac{561}{2,2} + \frac{1,92}{2,2} \pm \frac{1,96\sqrt{561}}{2,2} \right] \times \frac{1}{10^{-2}} = (256 \pm 21) \times 10^2$$

I limiti di fiducia dell'intervallo, espressi con due cifre significative sono: limite inferiore $\delta_L = 2,4 \times 10^4$ e limite superiore $\delta_U = 2,8 \times 10^4$ UFC/g

Nel caso i suddetti limiti venissero espressi come variazione, corrispondono rispettivamente a - 7,9 % e + 8,6 % del valore N calcolato.

4.2.1.4 Incertezza (intervallo di fiducia) di misura nei prodotti destinati al consumo umano e animale e nei campioni ambientali secondo la ISO/TS 19036:2006 + ISO 19036:2006/Amd/1:2009

La norma ISO 19036 è applicabile ai prodotti destinati al consumo umano ed animale e ai campioni ambientali dell'area di produzione e manipolazione di alimenti; propone la stima dell'incertezza di misura mediante il calcolo dello scarto tipo di riproducibilità (S_r) per ciascun metodo, ciascun misurando e per categoria di matrice.

Protocollo sperimentale



- Analizzare almeno 10 campioni per ogni categoria di matrice in parallelo e in giorni diversi.
- Utilizzare matrici alimentari naturalmente contaminate, a vari livelli di concentrazione microbica, altrimenti provvedere ad una contaminazione artificiale, in modo da ottenere conte comprese tra 10 e 300 UFC/piastra.
- Calcolare lo scarto tipo di riproducibilità per ogni microrganismo target (o gruppi) e per ciascuna categoria di matrice (o gruppi di matrici omogenee) secondo la suddivisione delle categorie riportata nella norma, e per ciascun modo, utilizzando la seguente equazione:

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\log a_i - \log b_i)^2}{2n}} \quad (29)$$

a_i e b_i = primo e secondo risultato della prova sullo stesso campione

4.2.1.4.1 Incertezza di misura

L'incertezza estesa U da associare al risultato di prova $y = \log_{10}x$, con fattore di copertura 2 (corrisponde approssimativamente al fattore di copertura 1,96 ad un livello di confidenza del 95%) , è calcolata mediante l'**equazione generale** (applicabile sia per le alte che per le basse conte):

$$U = 2 \times \sqrt{s_R^2 + \frac{0,18861}{\sum C}} \quad (30)$$

s_R è lo scarto tipo di riproducibilità

0,18861/ $\sum C$ componente della varianza dovuta alla distribuzione di Poisson presa a modello come possibile distribuzione in "natura" delle particelle microbiche:

$\sum C$ = somma del numero totale di colonie effettivamente contate su tutte le piastre.

L'incertezza estesa, con probabilità al 95%, Può essere due volte lo scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio, si può calcolare con la formula:

$$U = 2 S_R \quad (31)$$

ma solo nei casi di alti conteggi dato che in questa situazione la varianza dovuta alla distribuzione di Poisson, inserita nella equazione (30) diviene trascurabile

Comunque l'utilizzo della formula (31) comporta dimostrare che $\sum C > C_{lim}$ (32)

Dato C_{lim} come valore limite calcolato applicare l'equazione sotto riportata:

$$C_{lim} = \frac{(\log_{10} e)^2}{s_R^2 \times [(1 - 0,05)^{-2} - 1]} \approx \frac{1,75}{s_R^2} \quad (33)$$

Se la disequazione (32) è soddisfatta la differenza tra l'incertezza estesa (U) calcolata con (30) e quella con l'equazione semplificata (31) è in genere <del 5%

4.2.1.5 Incertezza (intervallo di fiducia) di misura nelle acque secondo la ISO 8199:2008

La norma ISO 8199 è applicabile ai campioni di acqua; essa propone il calcolo del risultato e dell'intervallo di fiducia al 95% di probabilità

Il calcolo del risultato può essere usato quando il numero totale di colonie sulle piastre è:

- Compreso tra 10 – 200 UFC (tecnica per spatolamento su piastra o filtrazione su membrana)
- Compreso tra 10 – 300 UFC (tecnica per inclusione su piastra)

Il risultato è espresso come UFC in uno specifico volume di riferimento di campione (di solito 100 mL o 1 mL) mediante l'equazione:

$$C_S = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_S \quad (34)$$

C_S = numero di UFC nel volume di riferimento V_S del campione

Z = somma delle colonie contate sulle piastre o sulle membrane derivate dalle diluizioni d_1, d_2, \dots, d_j o derivate da singoli volumi della stessa porzione analitica (campione o diluizione)

V_S = volume di riferimento scelto per esprimere la concentrazione dei microrganismi nel campione

V_{tot} = volume totale del campione originale distribuito nelle piastre sottoposte a conta, calcolato con l'equazione:

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i) \quad (35)$$

V_{tot} = volume totale calcolato del campione originale distribuito nelle piastre sottoposte a conta
 n_1, n_2, \dots, n_j = numero di piastre contate per la diluizione d_1, d_2, \dots, d_j

V_1, V_2, \dots, V_j = volume usato con la diluizione d_1, d_2, \dots, d_j

d_1, d_2, \dots, d_j = diluizione usata per i volumi V_1, V_2, \dots, V_j ($d=1$ per un campione non diluito, $d=0,1$, per un campione diluito 10 volte ecc.).

Esempio: (tecnica per spatolamento o per inclusione su piastra, semina in doppio) se il volume del campione usato (V_i) è 1 mL e i conteggi ottenuti alle rispettive diluizioni sono i seguenti:

Diluizione	Conta UFC/piastra		Somma
	I piastra	II piastra	
10^{-2}	81	97	178
10^{-3}	9	15	24

$$Z = 81 + 97 + 9 + 15 = 202$$

$$V_{tot} = (2 \times 1 \times 0,01) + (2 \times 1 \times 0,001) = 0,022 \quad \text{Applicando l'equazione (31)}$$

Se V_S (volume finale) è 1 mL, il conteggio finale C_S applicando l'equazione (34) è:

$$C_S = \frac{202}{0,022} \times 1 = 918 \text{ UFC/mL} \quad \text{quindi, arrotondando, } 9,2 \times 10^3 \text{ UFC/mL}$$

Esempio: (tecnica per filtrazione su membrana, semina in singolo)

Volume	Conta UFC/piastra	Somma
10 mL	82	82
100 mL	11	11

$$Z = 82 + 11 = 93$$

$$V_{tot} = (1 \times 100 \times 1) + (1 \times 10 \times 1) = 110 \quad \text{Applicando l'equazione (31)}$$

Se V_S (volume finale) è 100 mL, il conteggio finale C_S applicando l'equazione (34) è:

$$C_S = \frac{93}{110} \times 100 = 84 \text{ UFC} / 100 \text{ mL}$$

L'incertezza da associare al risultato (limiti dell'intervallo al 95%) sono calcolati mediante le seguenti equazioni:

1) Se $Z \geq 20$ UFC, il risultato finale con l'intervallo di fiducia al 95% di probabilità è dato dall'equazione:

$$C_S \pm 95\% CI = \left(\frac{Z \pm 2\sqrt{Z}}{V_{tot}} \right) \times V_S = \left(\frac{Z}{V_{tot}} \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{tot}} \right) \times V_S \quad (36)$$

2) Se $Z \geq 20$ UFC, l'effetto dell'asimmetria della distribuzione di Poisson sui limiti di confidenza è messo in conto mediante l'aggiunta di piccole correzioni nell'equazione (35):

$$CI = \left(\frac{Z + 2 \pm 2\sqrt{Z + 1}}{V_{tot}} \right) \times V_S \quad (37)$$

4. 3 Determinazione del valore MPN ISO 7218:2007

Formula generale per stabilire il valore approssimato del numero statisticamente più probabile (MPN)

$$MPN = \frac{Z_p * m_r}{\sqrt{m_s * m_t}}$$

Z_p = numero dei tubi pos.
 m_r = quantità di riferimento del campione in g
 m_s = quantità totale in g del campione nei tubi neg.
 m_t = quantità totale del campione in g in tutti i tubi

Il valore MPN di una sola serie di tubi

$$MPN = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[\frac{n}{n - z_p} \right]$$

m_r = quantità di riferimento del campione in g
 m_m = quantità in g del campione in ciascun tubo della serie
 \ln = logaritmo neperiano
 n = numero della serie dei tubi
 Z_p = tubi con reazione positiva

Stima con diluizioni semplici

MPN stima di confidenza 95%

$$x = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[\frac{n}{z_n \pm 2 \sqrt{\frac{z(n - z_n)}{n}}} \right]$$

z = limite di confidenza 95% superiore e inferiore
 m_r = quantità di riferimento del campione in g
 m_m = quantità in g del campione in ciascun tubo della serie
 \ln = logaritmo neperiano
 n = numero della serie dei tubi
 Z_n = tubi con reazione negativa

Stima con diluizioni multiple (Formula di Cochran)

$$SE = 0,58 \sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}}$$

SE = errore standard di \log_{10} MPN
 f = fattore di diluizione consecutive (per lo più 10)
 n = numero di tubi per diluizione

Esempio: 20 tubi in brodo doppio concentrato, seminato 5 mL di un campione diluito 0,1 g/mL. Crescita dopo incubazione positiva su 16 tubi.

Secondo la tab. sotto riportata indica 1,61 il numero più probabile di microrganismi presenti con un limite inf al 95% di 0,93 ed un limite superiore di 2,77

$$MPN = \frac{1,61}{0,5} \text{ per grammo} = 3,2 \text{ per grammo con intervallo di confidenza al 95\% compreso:}$$

$$> 95\% = \frac{2,77}{0,5} \text{ per grammo} = 5,5 \text{ per grammo} \quad < 95\% = \frac{0,93}{0,5} \text{ per grammo} = 1,9 \text{ per grammo}$$

Campione	Numero dei tubi positivi (*combinazione scelta)					MPN (calcolato secondo la Tab. n 1)	
						Prod. liquidi (mL ⁻¹)	Altri prod. (g ⁻¹)
	Prodotti liquidi 10 mL	1 mL	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL		
	Altri prodotti 1 g	10 ⁻¹ mL	10 ⁻² mL	10 ⁻³ mL	10 ⁻⁴ mL		
1	3*	3*	2*	1	0	1,1 x 10 ¹	1,1 x 10 ²
2	3	3*	3*	0*		2,4 x 10 ¹	2,4 x 10 ²
3	2	2	1*	1*	0*	7,4	7,4x x 10 ¹
4	3*	3*	0*	0	0	2,4	2,4 x 10 ¹
5	2*	2*	0*	1	0	2,1 x 10 ⁻¹	2,1

Valore MPN con limite di confidenza al 95% per una serie di 20 tubi				
N. tubi positivi	MPN	Incertezza tipo log ₁₀ MPN	Limite < 95%	Imite > 95%
1	0,05	0,434	0,01	0,36
2	0,11	0,307	0,03	0,42
3	0,16	0,251	0,05	0,50
4	0,22	0,218	0,08	0,60
5	0,29	0,195	0,12	0,69
6	0,36	0,178	0,16	0,80
7	0,43	0,165	0,20	0,91
8	0,51	0,155	0,25	1,03
9	0,59	0,147	0,31	1,16
10	0,69	0,140	0,37	1,30
11	0,80	0,134	0,44	1,46
12	0,92	0,130	0,51	1,65
13	1,05	0,126	0,59	1,85
14	1,20	0,123	0,69	2,10
15	1,39	0,121	0,80	2,40
16	1,61	0,121	0,93	2,77
17	1,90	0,122	1,09	3,29
18	2,30	0,127	1,30	4,08
19	3,00	0,141	1,58	5,67

Tabelle

Tabella 1 - Tabella MPN (Mac Crady)

Inoculo del campione di: 3x1; 3x0.1; 3x0.01 gr o mL

N. caratteristico	MPN per gr o mL	Categoria	Limiti di confidenza			
			95 %		99 %	
0 0 0	< 0.3	-	0.0	0.94	0.0	1.4
0 0 1	0.3	3	0.01	0.95	0.0	1.4
0 1 0	0.3	2	0.01	1.0	0.0	1.6
0 1 1	0.61	0	0.12	1.7	0.05	2.5
0 2 0	0.62	3	0.12	1.7	0.05	2.5
0 3 0	0.94	0	0.35	3.5	0.18	4.6
1 0 0	0.36	1	0.02	1.7	0.01	2.5
1 0 1	0.72	2	0.12	1.7	0.05	2.5
1 0 2	1.1	0	0.4	3.5	0.2	4.6
1 1 0	0.74	1	0.13	2.0	0.06	2.7
1 1 1	1.1	3	0.4	3.5	0.2	4.6
1 2 0	1.1	2	0.4	3.5	0.2	4.6
1 2 1	1.5	3	0.5	3.8	0.2	5.2
1 3 0	1.6	3	0.5	3.8	0.2	5.2
2 0 0	0.92	1	0.15	3.5	0.07	4.6
2 0 1	1.4	2	0.4	3.5	0.2	4.6
2 0 2	2.0	0	0.5	3.8	0.2	5.2
2 1 0	1.5	1	0.4	3.8	0.2	5.2
2 1 1	2.0	2	0.5	3.8	0.2	5.2
2 1 2	2.7	0	0.9	9.4	0.5	14.2
2 2 0	2.1	1	0.5	4	0.2	5.6
2 2 1	2.8	3	0.9	9.4	0.5	14.2
2 2 2	3.5	0	0.9	9.4	0.5	14.2
2 3 0	2.9	3	0.9	9.4	0.5	14.2
2 3 1	3.6	0	0.9	9.4	0.5	14.2
3 0 0	2.3	1	0.5	9.4	0.3	14.2
3 0 1	3.8	1	0.9	10.4	0.5	15.7
3 0 2	6.4	3	1.6	18.1	1	25
3 1 0	4.3	1	0.9	18.1	0.5	25
3 1 1	7.5	1	1.7	19.9	1.1	27
3 1 2	12	3	3	36	2	44
3 1 3	16	0	3	38	2	52
3 2 0	9.3	1	1.8	36	1.2	43
3 2 1	15	1	3	38	2	52
3 2 2	21	2	3	40	2	56
3 2 3	29	3	9	99	5	152
3 3 0	24	1	4	99	3	152
3 3 1	46	1	9	198	5	283
3 3 2	110	1	20	400	10	570
3 3 3	> 110	-	-	-	-	-

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

Significato delle categorie:

Più la categoria decresce, passando dalla categoria 1 alle successive (nell'ordine: 2, 3, 0), diminuisce anche la probabilità che il valore MPN ottenuto sia quello corrispondente all'effettivo numero di microrganismi presenti nel campione esaminato.

Tabella 2 - Tabella di Poisson

Valore x	Limite di confidenza 95%		Limite di confidenza 99%	
	Limite inferiore	Limite superiore	Limite inferiore	Limite superiore
0	0	3,6889	0	5,2983
1	0,0253	5,5716	0,0050	7,4301
2	0,2422	7,2247	0,1035	9,2738
3	0,6187	8,7673	0,3379	10,977
4	1,0899	10,242	0,6722	12,594
5	1,6234	11,668	1,0779	14,150
6	2,2019	13,059	1,5369	15,66
7	2,8144	14,423	2,0373	17,134
8	3,4538	15,763	2,5711	18,578
9	4,1154	17,085	3,1324	19,998
10	4,7954	18,390	3,7169	21,398
11	5,4912	19,682	4,3213	22,779
12	6,2008	20,962	4,9431	24,145
13	6,992	22,230	5,5801	25,497
14	7,6539	23,48	6,2307	26,836
15	8,3954	24,740	6,8934	28,164
16	9,1454	25,983	7,5670	29,482
17	9,9031	27,219	8,2506	30,791
18	10,668	28,448	8,9434	32,091
19	11,439	29,671	9,6445	33,383
20	12,217	30,888	10,353	34,668
21	12,999	32,101	11,069	35,946
22	13,787	33,308	11,792	37,218
23	14,580	34,511	12,521	38,484
24	15,377	35,710	13,255	39,745
25	16,179	36,905	13,995	41,000
26	16,984	38,096	14,741	42,251
27	17,793	39,284	15,491	43,497
28	18,606	40,468	16,245	44,738
29	19,422	41,649	17,004	45,976
30	20,241	42,827	17,767	47,209
31	21,063	44,002	18,534	48,439
32	21,888	45,174	19,305	49,665
33	22,716	46,344	20,079	50,888
34	23,546	47,512	20,857	52,107
35	24,379	48,677	21,638	53,324
36	25,214	49,939	22,422	54,537
37	26,051	51,000	23,208	55,748
38	26,891	52,158	23,998	56,955
39	22,733	53,314	24,791	58,161
40	28,577	54,469	25,586	59,363
41	29,442	55,621	26,384	60,563
42	30,270	56,772	27,184	61,761
43	31,119	57,921	27,986	62,956
44	31,970	59,068	28,791	64,149
45	32,823	60,214	29,598	63,341
46	33,678	61,358	30,407	66,530
47	34,534	62,500	31,218	67,717
48	35,391	63,641	32,032	68,902
49	36,25	64,781	32,847	70,085
50	37,111	65,919	33,664	71,265

Tabella 3 (da ISO 7218:1966)
Intervallo di confidenza del conteggio su piastra Petri – Probabilità 95%

N. Microorganismi *	Limite di confidenza		Scarto percentuale **	
	Inferiore	Superiore	Inferiore	Superiore
1	<1	6	- 97	+ 457
2	<1	7	- 88	+ 261
3	<1	9	- 79	+ 192
4	1	10	- 73	+ 156
5	2	12	- 68	+ 133
6	2	13	- 63	+ 118
7	3	14	- 60	+ 106
8	3	16	- 57	+ 97
9	4	17	- 54	+ 90
10	5	18	- 52	+ 84
11	6	20	- 50	+ 79
12	6	21	- 48	+ 75
13	7	22	- 47	+ 71
14	8	24	- 45	+ 68
15	8	25	- 44	+ 65

Legenda: *equivalente al numero di ufc presenti nella piastra, ** riferito al numero delle ufc della 1° colonna

Tabella 4 (da ISO 7218:1966)
Intervallo di confidenza del conteggio su piastra Petri – Probabilità 95%

N. Colonie *	N. Microorganismi	Limite di confidenza		Scarto percentuale **	
		Inferiore	Superiore	Inferiore	Superiore
1	1	< 1	3	- 97	+ 457
2	1	< 1	4	- 88	+ 261
3	2	< 1	4	- 79	+ 192
4	2	1	5	- 73	+ 156
5	2	1	6	- 68	+ 133
6	3	1	6	- 63	+ 118
7	4	2	7	- 60	+ 106
8	4	2	8	- 57	+ 97
9	4	2	9	- 54	+ 90
10	5	2	9	- 52	+ 84
11	6	3	10	- 50	+ 79
12	6	3	10	- 48	+ 75
13	6	3	11	- 47	+ 71
14	7	4	12	- 45	+ 68
15	8	4	12	- 44	+ 65
16	8	5	13	- 43	+ 62
17	8	5	14	- 42	+ 60
18	9	5	14	- 41	+ 58
19	10	6	15	- 40	+ 56
20	10	6	15	- 39	+ 54
21	10	6	16	-38	+ 53
22	11	7	17	- 37	+ 51
23	12	7	17	- 36	+ 50
24	12	8	18	- 36	+ 49
25	12	8	18	- 35	+ 48
26	13	8	19	- 35	+ 47
27	14	9	20	- 34	+ 46
28	14	9	20	- 34	+ 45
29	14	9	21	- 33	+ 44
30	15	10	21	- 32	+ 43

Legenda: * conta totale su due piastre per lo stesso campione, ** riferito al numero delle ufc della colonna 2

Bibliografia

AA.VV., *I rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare. Muffe, lieviti e micotossine*, Atti Conferenza Nazionale UNIPATH, Relazioni e posters, Bologna 5 maggio 1994.

ANPA-ARPA-APPA, *Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura*, 2003.

AURELI P., CAPASSO A., FENICIA L., FERRINI A.M., GIANFRANCESCHI M., “*Metodiche analitiche per il controllo microbiologico delle paste alimentari*” ISTISAN 89/9.

BELLINI M., CENTIOLI D., DE ZORZI P., SANSONE U., (APAT- Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici); CAPRISI S., PAGNOTTA R., PETTINE M., (CNR-IRSA Consiglio Nazionale delle ricerche – Istituto di ricerca sulle acque) *Metodi analitici per le acque* Vol.III APAT Manuali e linee guida 29/2003

BEZZICCHERI G., ERCOLESI M., MATTIOLI S., BEMPASSI L., BUONANNO E., *Indagini sulla presenza di aeromonas spp nelle acque potabili della provincia di Pesaro*, 98, 703-712, L'Igiene Moderna 1992.

BOTTAZZINI N., *Le basi statistiche per la valutazione della qualità dei risultati*, Corso ARPAT-UNICHIM Firenze 20 ottobre 2000.

BOTTAZZINI N., CAVALLI L., *Criteri statistici per il controllo della qualità dei risultati*, Atti seminario UNICHIM La qualità nei laboratori di microbiologia secondo la UNI CEI ISO-IEC 17025 – Competenza tecnica degli operatori e qualità dei risultati, Milano 24 settembre 2002.

BOTTAZZINI N., *Qualità del risultato nella pratica analitica microbiologica*, Atti seminario UNICHIM Sistema Qualità nei laboratori di analisi, Palermo 2004.

BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F., ZUCCA J. e AA.VV., *Microbiologia alimentare aspetti microbiologici della sicurezza e qualità*, Parte III pp.47-127, Tecniche nuove Editore 1990.

CASTELLANI PASTORIS M., *Colera: diagnosi di laboratorio*, Istituto Superiore di Sanità, 1976.

CEOL A., *Listeria monocytogenes - Cenni storici e stato dell'arte sulle tecniche laboratoristiche per la ricerca negli alimenti*, Regione Autonoma Valle d'Aosta. Agenzia Reg.le per la Protezione dell'Ambiente, Quaderni ARPA n.1/2000 Argomenti di microbiologia

DAVIS B.D., EISEN H.N., DULBECCO R., GINSBERG H.S., *Trattato di microbiologia*, II edizione italiana, Piccin Editore, 1986.

DE MEDICI D., FENICIA L., OREFICE L., STACCHINI A., *Metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti*, Istituto Superiore di Sanità Rapporti ISTISAN 96/35.

DECRETO LEGISLATIVO 2 febbraio 2001, n.31, *Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano*, Supp. Ord. Della G.U. Serie gen. n.52 del 3.3.2001.

DECRETO MINISTERIALE 13 gennaio 1993, *Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali e modalità per i relativi prelievi dei campioni*, G.U. Serie gen. n. 14 del 19.1.1993.

DENIS J., *Culture*, Vol.7 n.1 “Argomenti di microbiologia”, OXOID Italiana, 1989,1.

DENIS J., FILMS, Centre for Applied Microbiology Research, *Isolamento ambientale di legionella species*, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK.

DOMENICHINI G., *Impurità solide negli alimenti (FILTH-TEST)*, Chirotti Editore, 1984.

DROMIGNY E., VINCENT P., JOUVE J.L., *Campylobacter Listeria monocytogenes Yersinia enterocolitica*, Capitolo 6 pp.103-118.

EDWIN H. LENNETTE, ALBERT BALOWS, WILLIAM J. HAUSLER, JR, H.JEAN SHADOMY *Manual of clinical microbiology*, Fourth edition American Society for microbiology, Washington D.C. 1985

EURACHEM/EA, *Accreditation for Microbiological Laboratories*, Guide 04/10:2002.
http://www.eurachem.ul.pt/guides/eurochemea_micro.pdf

EUROPEAN CO-OPERATION FOR ACCREDITATION, Documento: EA 04-10 *Accreditation in Microbiological Laboratories* rev.2:2002.

FDA-BAM, *Bacteriological analytical manual*, 6TH Edition/1984. Division of microbiology Center for food and applied nutrition U.S. food and drug administration. Editore AOAC Arlinton, Virginia 22201-3301 USA.

FIL-IDF, *Controlle de la qualité en laboratoire de microbiologie: vulation des performances de l'analyste pour le denombrement des colonies*, 169, 1994.

GARERI E., *Sintesi delle moderne conoscenze del colera*, Annali Sclavo 1973,15, n.4 pp453-494.

GELLERA A., *Criteri di accettabilità dei risultati nelle prove microbiologiche*, Corso ARPAT (UNICHIM), Firenze 19 ottobre 2000

GELLERA A., *Esempi pratici inerenti ai criteri di accettabilità dei risultati delle prove e valutazione capacità operative del personale tecnico*, Atti seminario UNICHIM La qualità nei laboratori di microbiologia secondo la UNI CEI ISO-IEC 17025 – Competenza tecnica degli operatori e qualità dei risultati, Milano 24 settembre 2002.

ISO 7218-1996/Amd 1:2001, *Microbiology of food and animal feeding stuff. General rules microbiological examination*.

ISO-FDS 16140 (final draft) (progetto di norma UNI), *Microbiology of food and animal feeding stuff-protocol for the validation alternative methods*.

ISO-TR 13843-2000, *Water quality-Guidance on validation of microbiological methods*.

ISO 14461-1/ IDF 169-1:2005 *Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories Part 1: Analyst performance assessment for colony counts*.

ISO 14461-2/ IDF 169-2:2005 *Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories – Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps*.

ISO/TS19036:2006, *Microbiology of food and animal feeding stuffs -Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*.

ISO/TS 19036:2006/Amd.1: 2009, *Measurement uncertainty for low counts*.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ, *Ricerca di aeromonas nell'acqua minerale*, Metodo tratto da "Foodborne Pathogens" di A.H. VARNAM e M.G. EVANS WOLFE Publishing Ltd 1991, modificato dall'Istituto Superiore di Sanità.

KONEMAN E.W., ALLEN S.D., DOWELL V.R., HERBERT M. S., *Testo atlante di microbiologia diagnostica*, Delfino A. Editore 1987

LIGHTFOOT N.F., MAIER E.A., *Analisi microbiologica degli alimenti e dell'acqua- linee guida per l'assicurazione di qualità*, La Goliardica Pavese, 2002.

MAIELLO A., SPOLAOR D., *Guida per l'espressione dell'incertezza di misura nelle prove microbiologiche*, Augusta Edizioni & Manifestazioni, Revisione 0 - gennaio 2005.

MAROLI M., KHOURY C., *Impurità solide negli sfarinati e nei prodotti di trasformazione: metodo ufficiale di analisi (filth-test) e aspetti normativi*, Rapporti ISTISAN 96/8.

MINISTERO DELLA SANITÀ, Circolare n.17 del 13 sett.91. Integrazioni e modifiche alla circolare n.61 del 9 agosto 1976 *Analisi microbiologiche di acque minerali naturali*.

NIEMELÄ S.I., *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*, MIKES Publication J04/2003.

http://www.mikes.fi/documents/upload/J4_2003.pdf

NordVal, *Protocol for the validation of alternative microbiological methods*, Oslo 2004.

<http://www.nmkl.org/NordVal/Validation%20protocol%202004-01-01.doc>

OTTAVIANI F., Istituto Lattiero-Caseario e di Biotecnologie Agro-alimentari di Thiene (Dir. Disegna L.) Coordinato da Ottaviani F., *Microbiologia dei prodotti di origine vegetale ecologia ed analisi microbiologica*, Capitoli dal 14 al 19 pp203-366 Chirotti Editore 1996

OTTAVIANI M., BONADONNA L., *Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano*, Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 97/8

OTTAVIANI M., BONADONNA L., *Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano*, Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 00/14 Pt. 2.

PASQUINELLI F., *Diagnostica e tecniche di laboratorio 2*, Sez. II Batteriologia, Rosini Editrice Srl, Firenze 1981.

PENSO G., *Compendio di malattie infettive e parassitarie*, III edizione Editore Elli & Pagani 1974. Collana da "La ricerca in clinica e in laboratorio".

RAPPORTI ISTISAN, *Metodi analitici per il controllo microbiologico degli alimenti*, 96/35

UNICHIM, *Guida alla realizzazione di un Sistema Qualità conforme alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 in laboratori di microbiologia*, Manuale n.199, 2005

UNI 10674: Water intended for human consumption General guidance for microbiological examination, Seconda edizione marzo 2002.

UNI 10674-2000: Acque destinate al consumo umano - Guida generale per determinazioni microbiologiche.

UNI EN 12780: Water quality-Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration, ottobre 2002.

UNI EN ISO 6222: Water quality-Enumeration of culturable micro-organisms Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium (ISO 6222:1999), febbraio 2001.

UNI EN ISO 6887-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilution for microbiological examination. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions, dicembre 2000.

UNI EN ISO 7899-2: Water quality Detection and enumeration of intestinal enterococci, dicembre 2003.

UNI EN ISO 9308-1: Recipimento della norma europea “Water qualità. Detection enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria. Membrane filtration method”, luglio 2002.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 p.to 5.4 Metodi di prova e di taratura e validazione dei metodi.

UNI CEI ENV 13005:2000: Guida all’espressione dell’incertezza di misura.

UNI EN ISO 6887/1-2000: Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Preparazione dei campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l’analisi microbiologica - Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali.

UNI EN ISO 7218:2007: Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

UNI ENV ISO 11133-1:2002: Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali - Guida per la preparazione e la produzione di terreni colturali - Guida generale per l’assicurazione della qualità per la preparazione dei terreni colturali in laboratorio.

UNI CEN ISO/TS 11133-2:2006: Microbiologia di alimenti e di mangimi per animali - linee guida per la preparazione e la produzione di terreni colturali - parte 2: linee guida pratiche sulle prove di prestazione di terreni colturali.

UNI 10674:2002: Acque destinate al consumo umano, Guida generale per determinazioni microbiologiche

UNI EN ISO 8199:2008: Water quality-general guidance on the enumeration of micro organisms by culture. (Qualità dell’acqua-Linea guida generale per la conta di microrganismi su terreno di coltura).

UNI ENV ISO 13843 :2003: Qualità dell’acqua, Guida per la validazione di metodi microbiologici.

UNI EN ISO 4833:2004: Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la conta di microrganismi – Tecnica della conta delle colonie a 30 °C.

UNI EN ISO 16140:2005: Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Protocollo per la validazione di metodi alternativi.



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

Via Nicola Porpora 22, 50144 Firenze
www.arpat.toscana.it



ARPAT

Agenzia regionale
per la protezione ambientale
della Toscana

www.arpat.toscana.it



9788896693100