

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

*A Dado
e a tutti gli amici e colleghi
che hanno reso
unici e indimenticabili
gli anni di comune lavoro*

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

a cura di

Ademaro Rinaldi Lazzerini



Firenze, giugno 2005

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

Si ringraziano, con riconoscenza

gli amici e colleghi che hanno, con i loro consigli e la loro esperienza, reso possibile la realizzazione di questo lavoro.

La Dott.ssa Patrizia Bolletti, responsabile dell'Attività di laboratorio del Dipartimento aretino, per l'aiuto, l'incoraggiamento ed il sostegno in questa fatica.

Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Patrizia Tinti, responsabile del Sistema Qualità del Dipartimento di Arezzo e Supervisore delle prove microbiologiche, per gli importanti suggerimenti e per la revisione del lavoro.

Il collega e amico Gino Ciofini per aver contribuito, con competenza ed impegno, alla stesura del testo e Sonia Parati, per le opportune critiche e le preziose osservazioni.

Avvertenza:

i terreni riportati nella presente pubblicazione sono in gran parte forniti dalla Ditta OXOID di Milano

© ARPAT 2005

Coordinamento editoriale: Silvia Angiolucci, ARPAT

Redazione: Silvia Angiolucci, Gabriele Rossi, ARPAT

Realizzazione editoriale e stampa: Litografia I.P., Firenze, giugno 2005

Copertina: ALTA srl

INDICE

Prefazione	7
Carlo Bartoli, ARPAT, <i>Responsabile del Dipartimento provinciale di Arezzo</i>	
Patrizia Bolletti, ARPAT, <i>Responsabile Attività di laboratorio del Dipartimento provinciale di Arezzo</i>	
Preparazione e semina campioni	9
Alimenti	11
Acque	13
Semina dei campioni	15
Schemi di diagnostica batteriologica	17
Espressione dei risultati – Ripetibilità	61
Terreni di coltura – Reagenti e soluzioni	65
Premessa	67
Valutazione della produttività e della selettività dei terreni colturali per prove microbiologiche	68
Terreni di coltura	69
Reagenti e soluzioni	98
Tabelle e definizioni	101
Bibliografia	107

PREFAZIONE

L'idea primaria che ha portato a questa pubblicazione nasce dall'esigenza di avere una semplice raccolta di metodiche: progressivamente i contenuti sono stati aggiornati e ampliati fino ad arrivare alla stesura di questo volume.

Lo scopo è quello di presentare, in modo sintetico, veloce, di facile e immediata comprensione i procedimenti analitici che il laboratorio in genere adotta, sui quali si basa la ricerca per determinare la sicurezza e la qualità microbiologica di un alimento e valutare la qualità delle acque destinate al consumo umano.

Tale metodica di ricerca si basa essenzialmente sull'esperienza e sul bagaglio di conoscenze accumulato in anni di pratica laboratoristica all'interno dell'Unità operativa "Alimenti" del Dipartimento provinciale ARPAT di Arezzo. Dopo aver mosso i primi, cauti, passi all'inizio degli anni '90, il laboratorio ha saputo conquistarsi, attraverso l'impegno profuso dal Dott. Angelo Viti e dai suoi tecnici, un posto di rilievo e di riferimento nell'ambito del controllo microbiologico degli alimenti e delle acque destinate al consumo umano.

Il laboratorio chimico-microbiologico del Dipartimento di Arezzo è stato, infatti, tra i primi in Italia a corrispondere a quanto richiesto dalla Direttiva 93/99 CEE, recepita con D.Lgs 156/97, che prevede l'obbligo, per i laboratori pubblici che eseguono il controllo ufficiale degli alimenti, di operare in conformità con la norma internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e di conseguire il certificato di accreditamento SINAL (Sistema Nazionale Accreditamento Laboratori di prova), nonché il certificato di riconoscimento ORL-ISS (Organismo Riconoscimento Laboratori Istituto Superiore di Sanità).

Il volume dedica una sua parte agli alimenti: i metodi di ricerca illustrati, ormai sperimentati ed affidabili, spesso indicati nei provvedimenti legislativi o comunque risalenti a fonti normative riconosciute (Istituto Superiore di Sanità – International Standard Organisation, ISO – Manuali e linee guida APAT) sono quelli in uso nel laboratorio del Dipartimento.

Non mancano, per amor di completezza, alcuni riferimenti a tecniche analitiche che, per quanto superate, hanno comunque rappresentato un metodo significativo di ricerca.

Nella parte dedicata all'analisi delle acque, indispensabile strumento di controllo per la salute pubblica, molte delle metodiche descritte rappresentano la traduzione in schemi di tecniche certificate (UNI EN ISO); altre sono estratte dal 3° vol. dei *Manuali e linee guida* 29/2003 di APAT, mentre per le acque destinate al consumo umano il riferimento è il D.Lgs n.31/2001.

L'ultima parte è dedicata alle varie fasi di preparazione dei terreni culturali.

La "pretesa" di aver voluto fare un piccolo manuale trova la sua giustificazione nel fatto di aver visto per anni il laboratorio del Dipartimento percorrere un cammino di crescita continua, grazie soprattutto a esperti biologi e tecnici alla cui disponibilità, pazienza e professionalità dobbiamo la stesura di questo volume. La pubblicazione si rivolge, in modo volutamente sintetico e pratico, in particolare agli "addetti ai lavori" del settore, la cui preparazione, ormai a livello universitario, consente loro di essere non più semplici esecutori di tecniche, ma interpreti dei risultati ottenuti, e dunque anche, più in generale, "ispiratori" per gli altri colleghi.

Ed è proprio a questi ultimi che ci auguriamo di poter fornire un riferimento, nonché un'occasione di confronto tra le varie tecniche illustrate e quelle da loro solitamente impiegate.

Carlo Bartoli e Patrizia Bolletti

PREPARAZIONE E SEMINA CAMPIONI

ALIMENTI

Prelevare asepticamente e in modo rappresentativo - quindi in più punti - gr 30 di prodotto (*m*) dal campione da analizzare e trasferirlo in contenitore sterile.

Aggiungere il diluente Buffered Peptone Water (T13.)¹ in ml nella misura di 9 x *m*, in modo da ottenere una diluizione 1:10 (usare per praticità la notazione esponenziale negativa, esempio 41 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.

Campioni solidi o semisolidi

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

Prodotti secchi

Vanno mantenuti a temperatura di 2-4°C per circa 1 ora dopo l'aggiunta del diluente e prima di omogenizzarli.

Campioni surgelati

Vanno scongelati per circa 12 ore, e comunque non oltre le 24 ore, a 2-4°C prima di prelevare la quantità necessaria. Se il campione è disgregabile (es. gelato) procedere senza effettuare lo scongelamento.

Campioni liquidi

Agitare più volte il campione per renderlo omogeneo. 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 di carne

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

Campioni in polvere

Mescolarli agitando il contenitore, prelevare la quantità necessaria ed omogenizzarla con il diluente, far riposare per circa 5 minuti agitando periodicamente.

Campioni di burro

Sciogliere l'aliquota in bagno maria dentro un contenitore sterile con un volume doppio di soluzione di Ringer 1/4 (T43.). Mantenere in bagno maria fino a completa fusione mescolando. Attendere la separazione della materia grassa della fase acquosa (2 ml della fase indiluita corrispondono ad 1 gr 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

¹ I codici tra parentesi indicano i terreni di coltura e i reagenti descritti nella sezione successiva "Terreni di coltura – Reagenti e soluzioni"

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 e 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 tritarli in stomacher con BPW (T13.) nel rapporto ponderale di 1:10. I tuorli e gli albumi vanno anch'essi omogenizzati in stomacher, prelevandone poi 50 gr. e trasferendoli in 450 ml di BPW (T13.).

Omogenizzazione

Se per l'omogenizzazione dei campioni viene usato un omogenizzatore ad alta velocità (mixer) iniziare con brevi impulsi fino a raggiungere, al termine del procedimento, 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 (41), con pipetta sterile, 10 ml del campione in bottiglia contenente 90 ml di H₂O triptonata sterile 0.1% (T50.) (diliz. 42). Chiudere e agitare la bottiglia per circa 25 volte. Se richiesto trasferire da questa (42) altri 10 ml in una nuova bottiglia con 90 ml di H₂O triptonata sterile 0.1% (T50.) (diluiz. 43), e così di seguito fino a raggiungere la diluizione desiderata.

ACQUE

Normativa

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 di cibi e bevande o per altri usi domestici;
- acque usate da imprese alimentari per fabbricazione, trattamento o conservazione, o 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.

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.

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 +4°C fino al momento delle analisi.

Il D.Lgs. sopra citato prevede due tipi di controllo:

Controllo di routine, con i seguenti parametri da ricercare:

- *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.

Controllo di verifica: tutti i parametri del controllo di routine e, a discrezione dell'Azienda Unità Sanitaria Locale, i seguenti parametri:

- | | |
|--------------------------|------------------------------------|
| - Alghe | - Batteriofagi anti <i>E. coli</i> |
| - Elminti | - Enterobatteri patogeni |
| - Enterovirus | - Funghi |
| - Protozoi | - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| - Stafilococchi patogeni | |

Per quanto riguarda le acque minerali 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 prelevamento (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). 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.

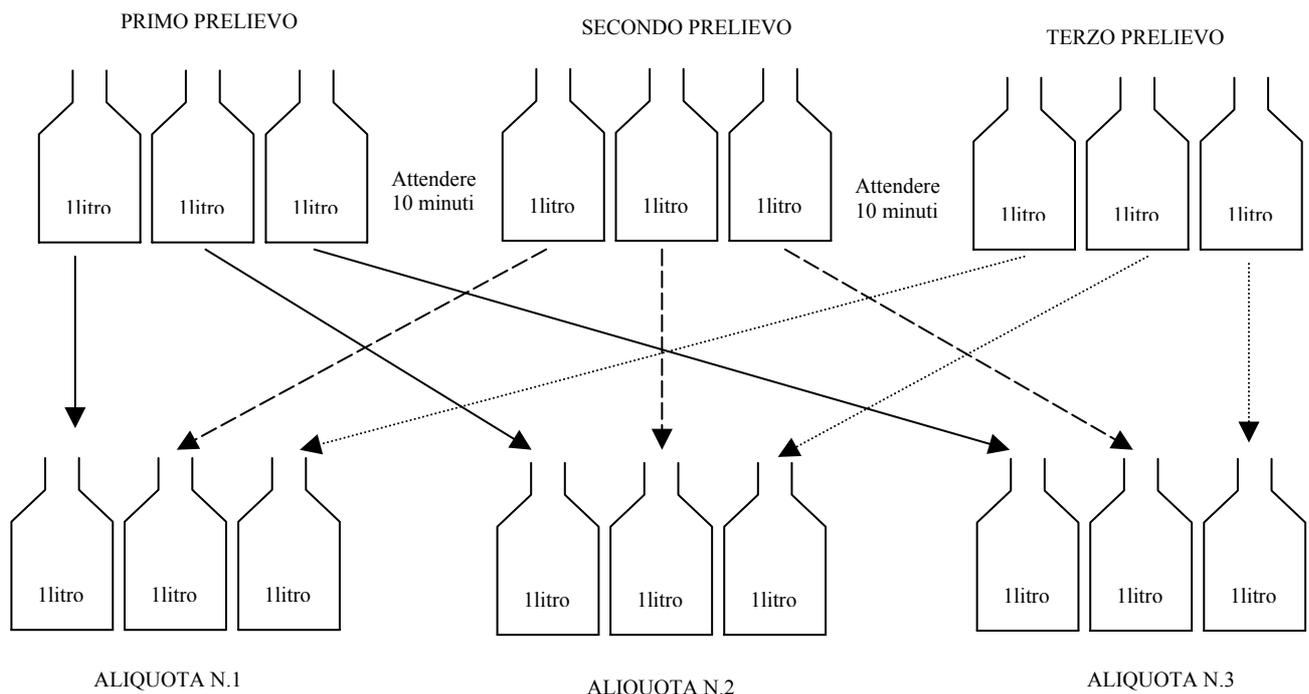
Il trasporto dei campioni è fatto con cassetta coibentata, munita di batterie di ghiaccio; le prove microbiologiche devono iniziare prima possibile, entro comunque il periodo di validità commerciale del prodotto.

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

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 gr di palline di vetro sterili e l'agitazione deve proseguire fino ad ottenere un'efficace degasificazione.

Acque minerali - Schema operativo di prelievo



SEMINA DEI CAMPIONI

Semina campione su piastre petri (tecnica di inclusione - pour plate)

Preparare 2 piastre Petri (\therefore 90 - 100 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 bagnomaria 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 (spread technique)

Distribuire su terreno già solidificato in piastra Petri 1 ml del campione da analizzare usando 1 o 2 piastre per ogni diluizione allestita.

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

SCHEMI DI DIAGNOSTICA BATTERIOLOGICA

Procedura schematica ricerca microrganismi

Parte prima

Prelevare in più punti e asetticamente 30 gr di prodotto dal campione da analizzare.
Trasferirlo in contenitore sterile e aggiungere 270 ml di BPW (T13.)
Diluizione 1:10 (-1)

Omogenizzare, per circa 2 minuti, con apparecchio ad alta velocità (mixer)
o con apparecchio di tipo peristaltico (stomacher).

Lasciar riposare per circa 10 minuti e poi procedere come segue

250 ml

In termostato a $36,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Ricerca salmonelle

50 ml (Soluzione madre) diluizione 1:10 (-1)

DILUIZIONI SUCCESSIVE

10 (1)ml di Soluz. madre più 90 (9) ml
di AT (T59.)
Diluizione 1:100 (-2)

10 (1) ml della diluizione 1:100 (-2)
più 90 (9) ml di AT (T59.)
Diluizione 1:1000 (-3)

Procedere così di seguito fino alla
diluizione desiderata (in genere fino alla -5 o -6)

Dalle varie diluizioni allestite vengono in genere
ricercati i seguenti microrganismi:

Carica batterica mesofila totale
Enterobacteriaceae
Coliformi totali
Coliformi fecali

Escherichia coli
Streptococchi gruppo D (Enterococchi)
Staphylococcus aureus
Aeromonas

Bacillus cereus
Clostridi solfito-riduttori
Clostridium perfringens
Clostridium botulinum

Parte seconda

Ricerca di: *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*

Per ogni ricerca prelevare in più punti e asetticamente le quantità di prodotto necessario. Trasferirlo in contenitore sterile e aggiungere il diluente.

YERSINIA ENTEROCOLITICA
preparare la soluzione madre del campione
diluendo una quantità x del campione in
BPW (T13.) in rapporto campione/terreno 1:10 (-1)

↓
Omogenizzare

↓
Lasciar riposare 10 minuti circa

↓
Vedi scheda "*Yersinia enterocolitica*"

CAMPYLOBACTER
30 gr del campione in esame
in 270 ml di CSEB (T15.)

↓
Omogenizzare

↓
Lasciar riposare 10 minuti circa

↓
Vedi scheda "*Campylobacter*"

LISTERIA MONOCYTOGENES
25 gr del campione in 275 ml
di LEB (T34.)

↓
Vedi scheda
"*Listeria monocytogenes*"

VIBRIO CHOLERAEE

Il campione da sottoporre ad analisi deve essere rappresentativo e di peso non inferiore a 200gr. aliquota. Va mantenuto a temperatura di 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 intervalvare.

↓
Pesare 100 gr da ogni campione
e omogenizzarli

↓
Vedi scheda "*Vibrio cholerae*"

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

25 gr del campione in esame in 225 ml di SPB (T50.) 25 gr del campione in esame in 225 ml di APA (T02.)

↓
Omogenizzare

↓
Vedi scheda
"*Vibrio parahaemolyticus*"

↓
Omogenizzare

↓
Vedi scheda
"*Vibrio parahaemolyticus*"

Ricerca di Legionella spp

Campionamento

- Acqua fredda o calda
- Depositi in serbatoio
- 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 raccolti in recipienti sterili. Se acqua clorata aggiungere tiosolfato di sodio (soluzione al 10% 0,1 ml per 100 ml di acqua)
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 dalla luce, e gli esami vanno iniziati entro 24 ore dal prelievo. Vedi scheda "Legionella pneumophila".

Carica batterica mesofila

CARATTERISTICHE

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

ALIMENTI

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

TECNICA DI ISOLAMENTO

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

1 ml delle varie diluiz. nelle piastre allestite

15 ml di PCA (T44.) o di AG (T04.) per escludere i lattobacilli
Agitare delicatamente e far solidificare.

32 ± 1°C 48 ± 3 ore

CRESCITA BATTERICA

> 30 UFC e < 300 UFC

≤ 30 UFC

RISULTATO ESPRESSO

RISULTATO ESPRESSO

RISULTATO ESPRESSO

Meno di 1×10^n UFC/gr o ml

Annotare i conteggi relativi a 2 diluizioni successive

Vedi "Stima della ripetibilità in due prove in parallelo. Doppia piastra per ciascuna diluizione"

Numero UFC/gr o ml

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + 0.1n2)d}$$

Numero UFC/gr o ml

OVVERO :

10^n = Inverso del fattore di diluizione più basso (in genere 10 o 100)

$\sum C$ = somma delle colonie nelle piastre considerate

V = volume dell'inoculo seminato in ogni piastra (1 ml in genere nella tecnica pour-plate)

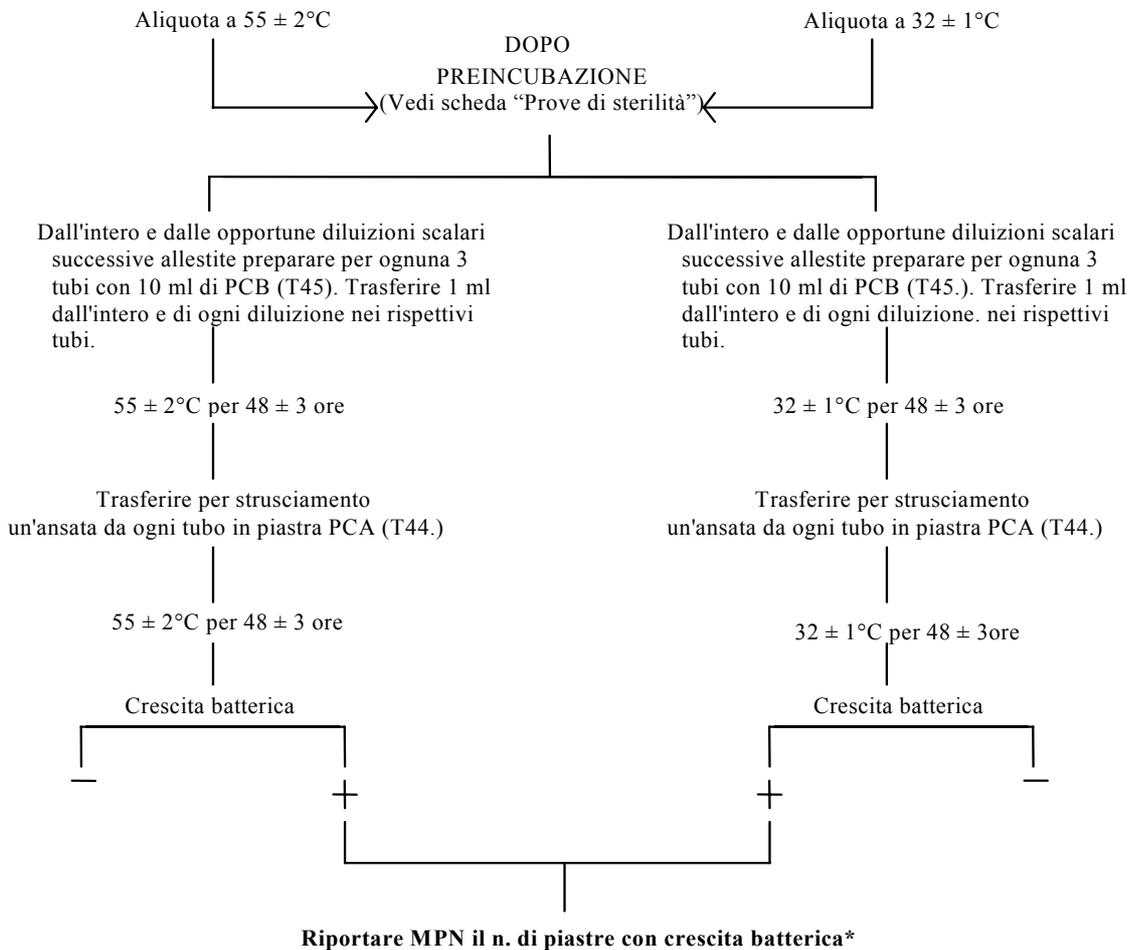
$n1$ = numero delle piastre considerate per la prima diluizione

$n2$ = numero delle piastre considerate per la seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione (in genere 0.1 - 0.01)

Prove di sterilità

(Numero più probabile - Metodo MPN/ gr o ml)



* 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 e moltiplicarlo per l'inverso del fattore di diluizione.

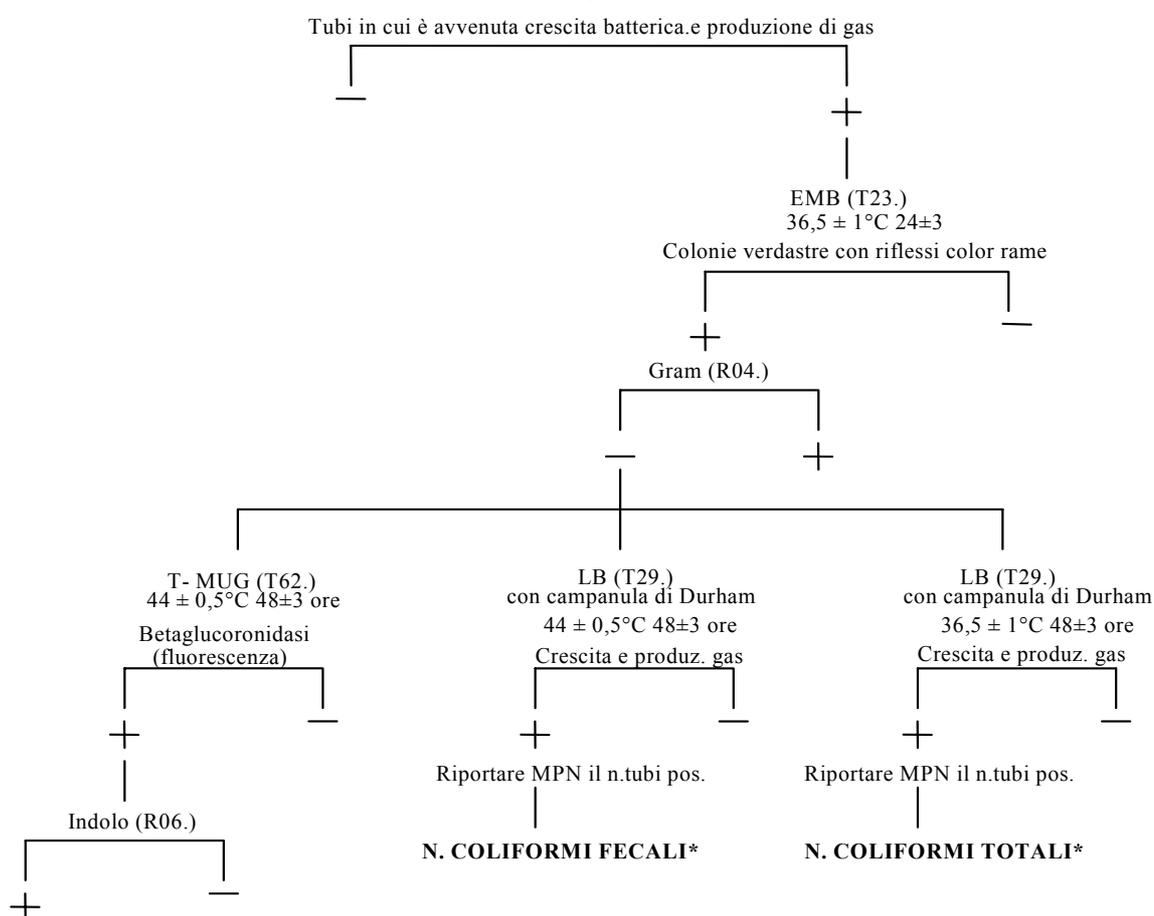
Coliformi totali - fecali - Escherichia coli

(Numero più probabile - Metodo MPN/gr o ml)

CARATTERISTICHE	Famiglia enterobatteriaceae. 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 EC è betaglucuronidasi e indolo + . Alcuni sono associati alla diarrea infantile (EPEC enteropatogeni E.Coli) altri produttori di enterotossine (ETEC enterotossigeni E:Coli), altri malattie dissenteriche (EIEC enteroinvasivi E.Coli).
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Incubazione 7-12 ore (solito 12-24); dolori addominali febbre vomito diarrea con sangue e muco; durata 3-5 gg.
ALIMENTI	Larghissima diffusione ambientale suolo,acque, animali, uomo in materie prime sia di origine animale che vegetale.

TECNICA DI ISOLAMENTO

Dalla soluzione madre del campione in esame e dalle opportune diluizioni scalari successive allestite, preparare, per ognuna, 3 tubi con 10 ml di BGB 2% (T12.) con campanula di Durham Trasferire 1 ml di ogni diluizione nei rispettivi tubi. A 36,5 ± 1°C per 48 ± 3 ore

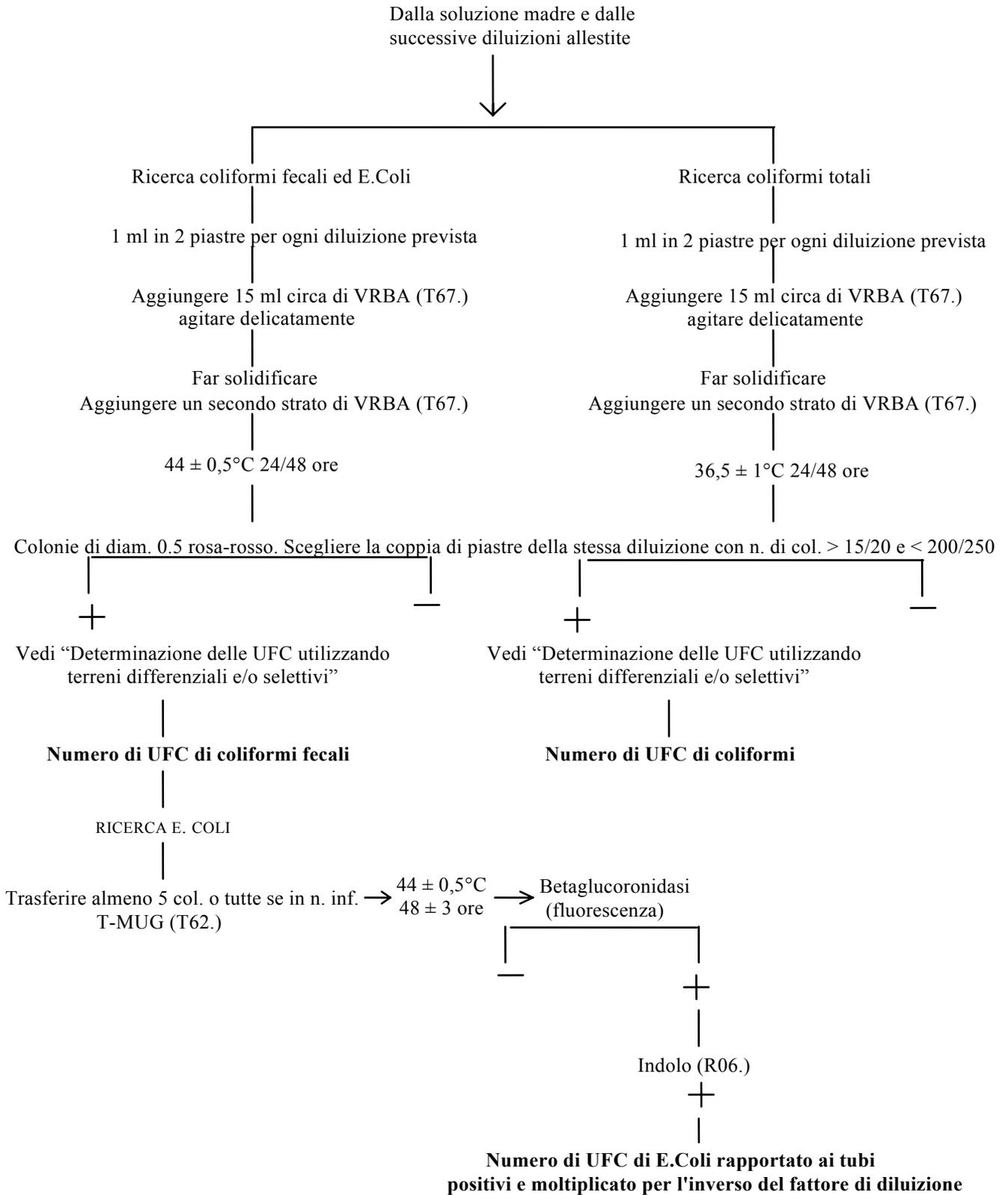


Riportare MPN il n.tubi pos.

N. ESCHERICHIA COLI*

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

Metodo per inclusione in piastra



Su terreno cromogenico

TECNICA DI ISOLAMENTO

Dalla soluzione madre e dalle successive diluizioni allestite



1 ml di ciascuna diluizione in piastra (2 piastre per ogni diluiz.) di TBX Medium (T61.)



Incubare a $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore



Colonie blu-verdi



+

Vedi "Determinazione delle UFC utilizzando terreni differenziali e/o selettivi"



N. di UFC di ESCHERICHIA COLI/gr o ml



PROVA DI CONFERMA



Test diretto dell'indolo



Alcune gocce del reattivo di Kovac (R06.)
Comparsa di color rosso



-

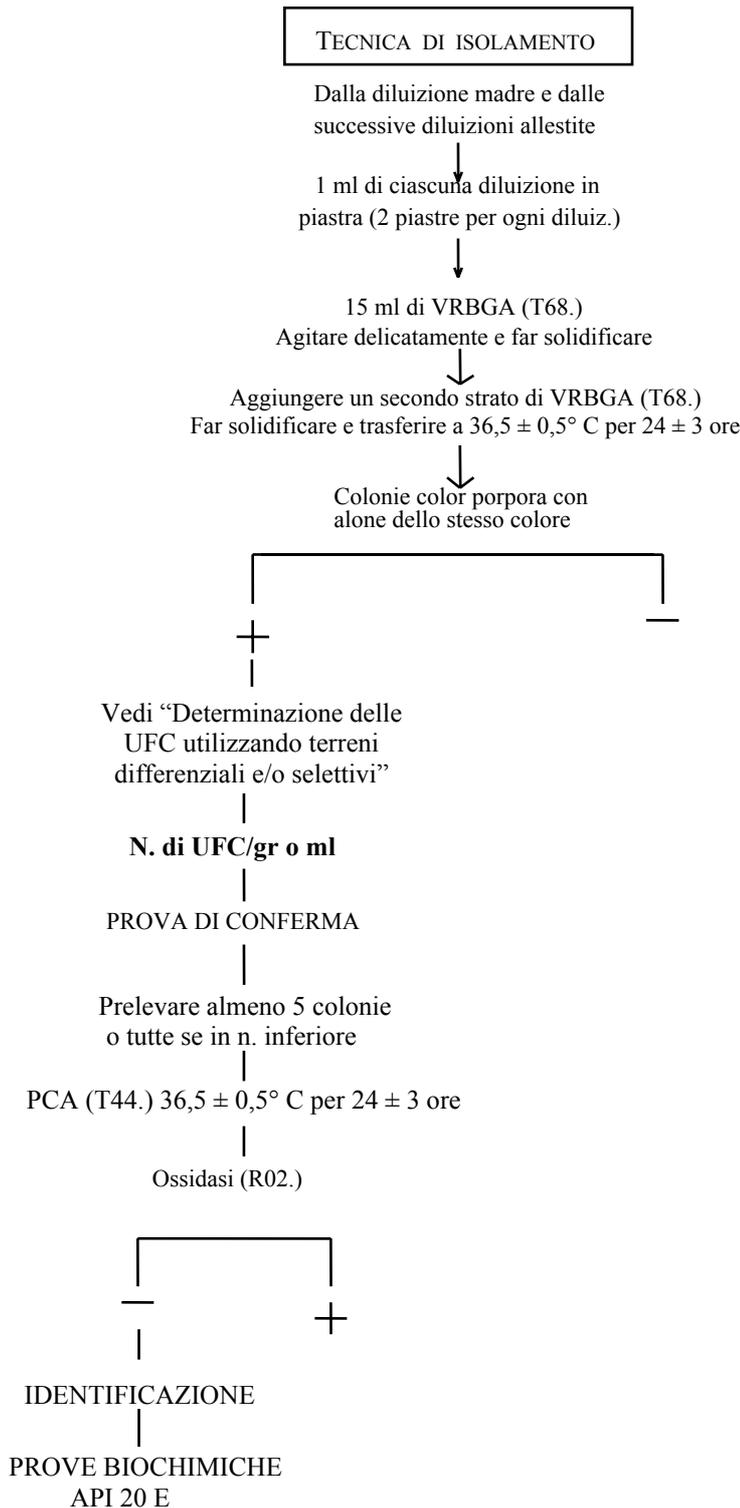
+

N. di UFC di ESCHERICHIA COLI/gr o ml

Enterobacteriaceae

(Metodo per inclusione in piastra)

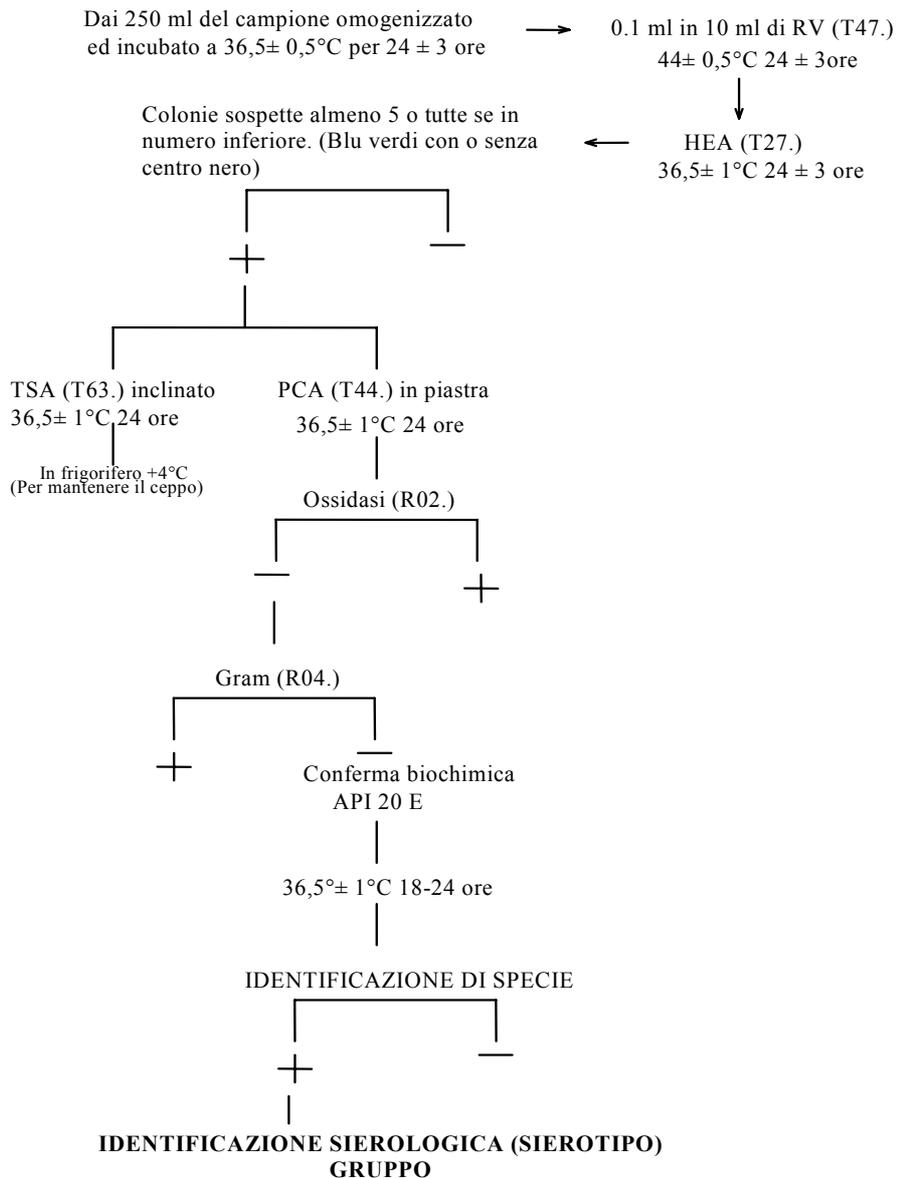
CARATTERISTICHE	Si riconoscono 28 generi e 90 specie. Metabolismo degli zuccheri sia respiratorio che fermentativo. Sono Gram -, Glucosio + con formazione di acidi e gas, Ossidasi. Riducono i nitrati a nitriti.
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Sono causa di infezioni e malattie con decorso e gravità variabile secondo il genere interessato.
ALIMENTI	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.



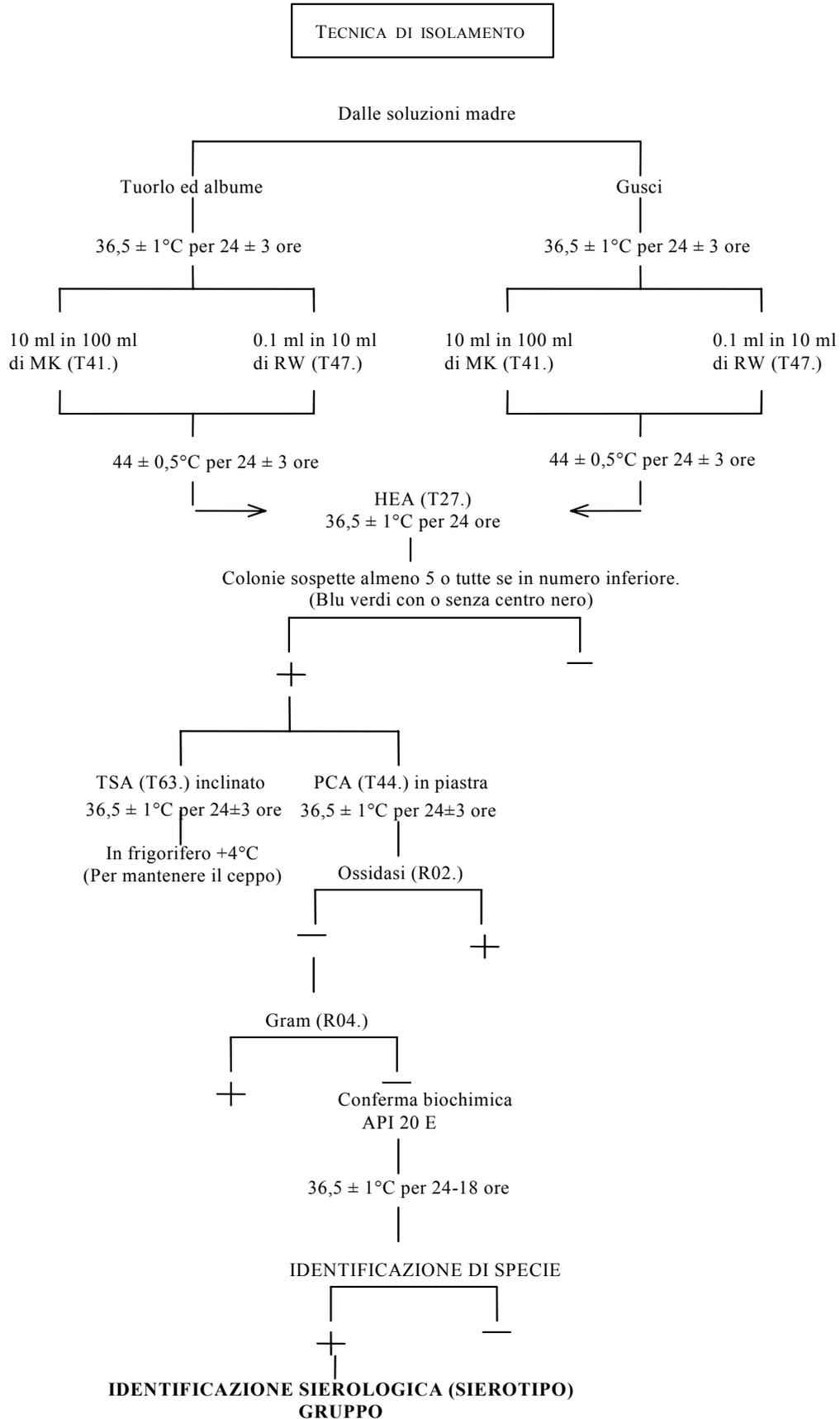
Salmonella

CARATTERISTICHE	Gram - Ossidasi- Catalasi + Gluc.+ Malt.+ Mann.+ Sorb. + Latt.- (+) Adonitolo - Ureasi - Indolo - (+) V.P. - Riduzione dei nitrati + Crescita 35 - 37°C Aw 0.95 - 0.99 pH 4.5 - 9.0
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Incubazione 12 - 36 ore. Diarrea, dolori add., vomito, febbre. Durata da alcuni giorni a 3 settimane.
ALIMENTI	Prodotti carnei. Salumi. Polli. Ovoprodotti.

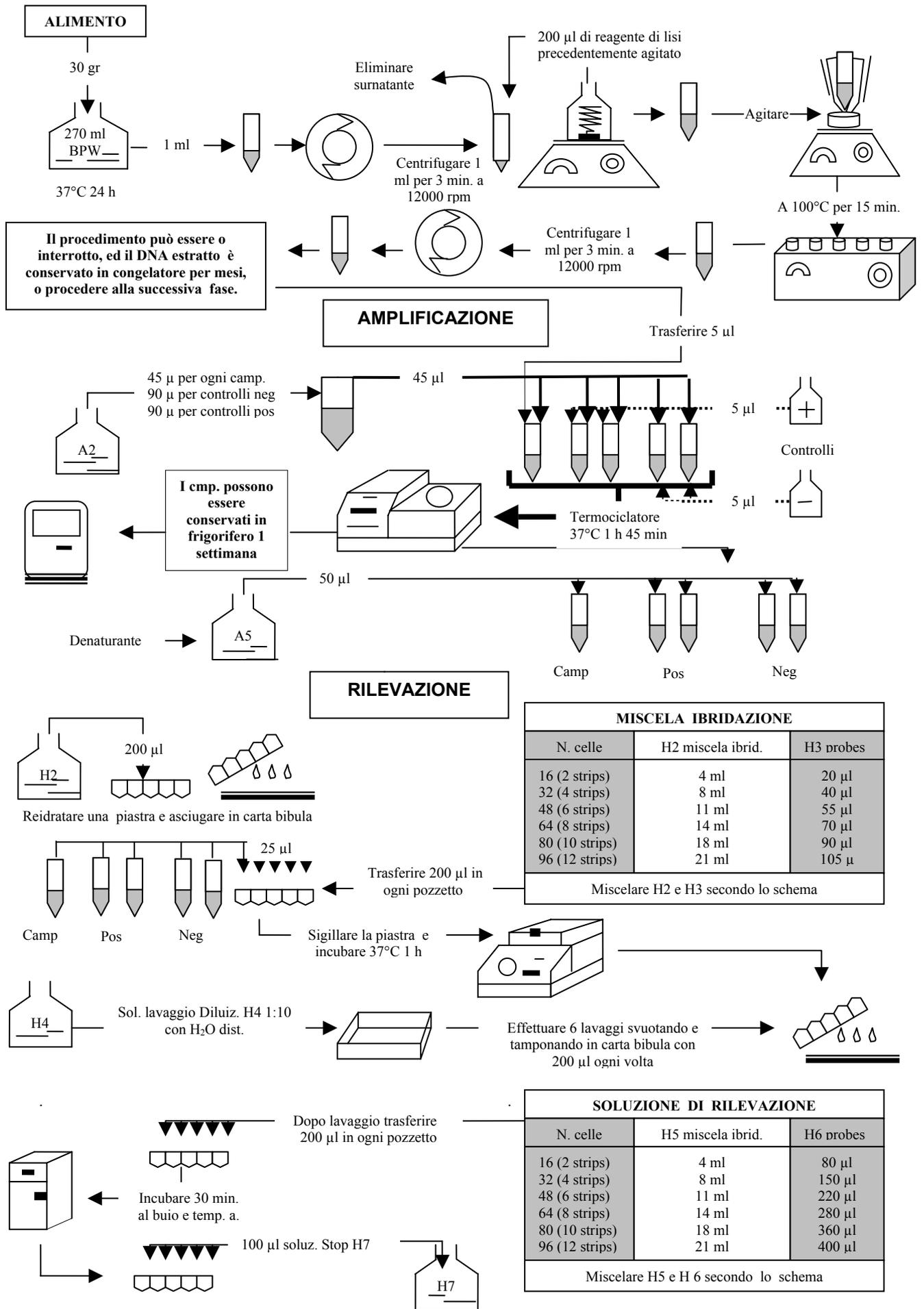
TECNICA DI ISOLAMENTO



Salmonella su uova fresche



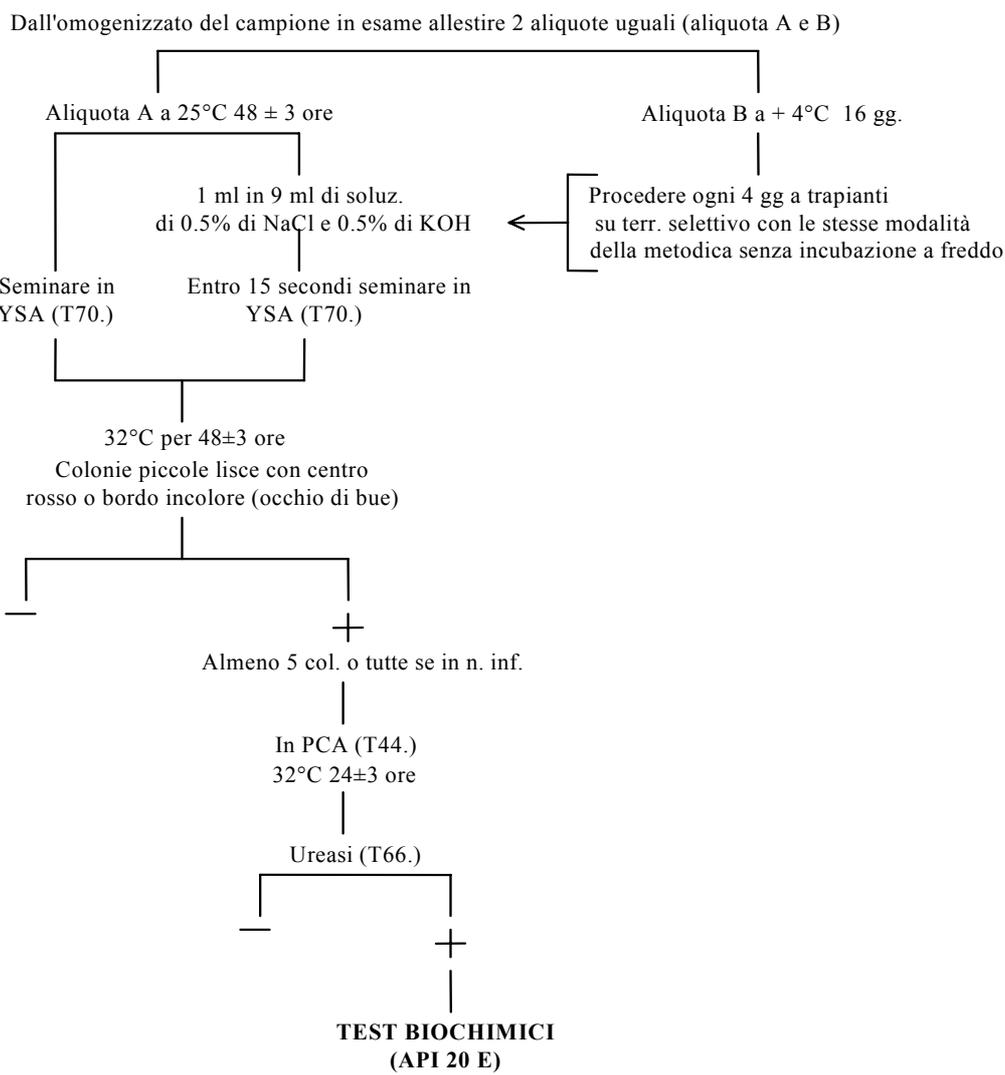
Polymerase Chain Reaction (PCR) – Estrazione Salmonella spp



Yersinia enterocolitica

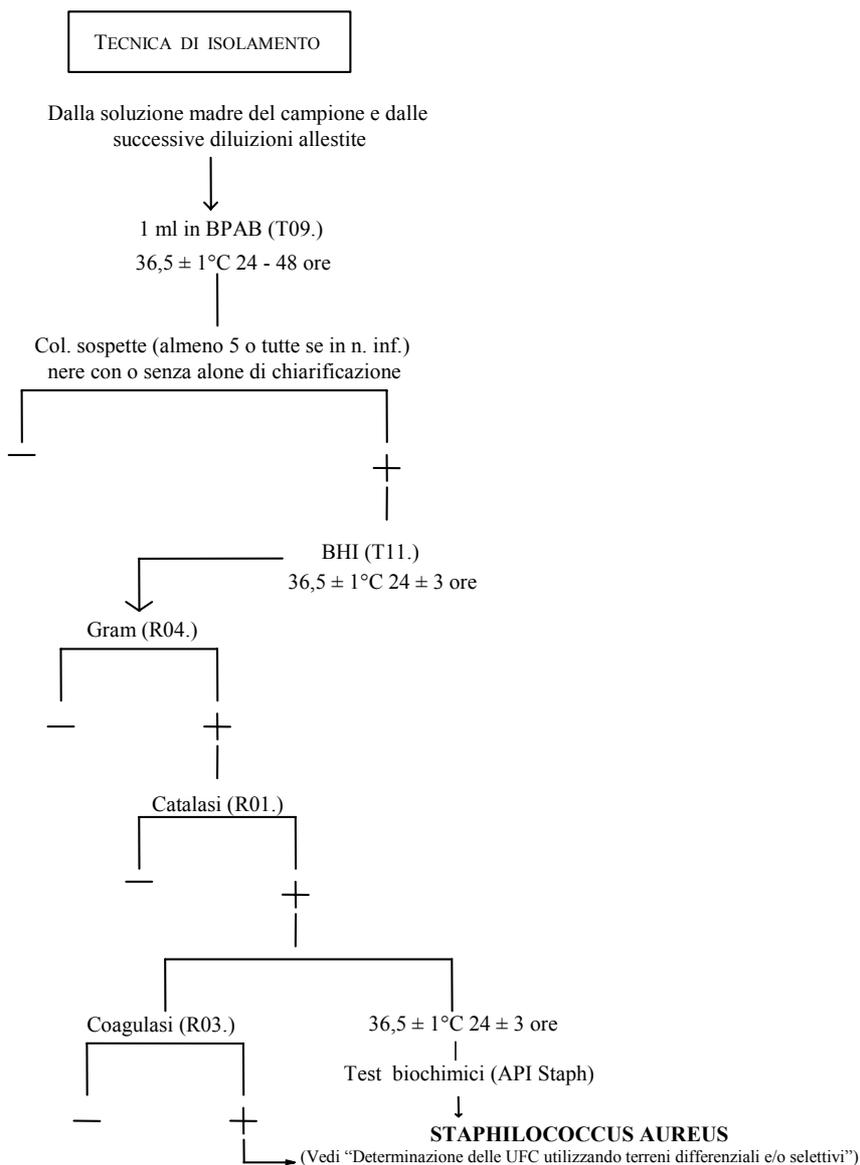
CARATTERISTICHE	Stesse carat. delle enterobacteriaceae. Gram - Riduce i nitriti enterotossina termostabile e ac. resistente pH 5-9 (7.7-7.8). Immobile a 37°C mobile a 25°C (Y. pestis immobile) temp. di inattivazione 60°C 1-3 min. Resistente NaCl fino al 5%. Ureasi+ Gluc.+ Latt.- Esculina-Gas da glucosio - H ₂ S -.
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Sintom. talvolta simile a salmonella. Diarrea liquida o pastosa purolenta maleodorante. Altri sintomi incostanti: febbre, dolori addominali, vomito.
ALIMENTI	Carne di maiale. Manzo. Pollame. Latte. Uova. Riso. Pesce. Patate. Carote.

TECNICA DI ISOLAMENTO



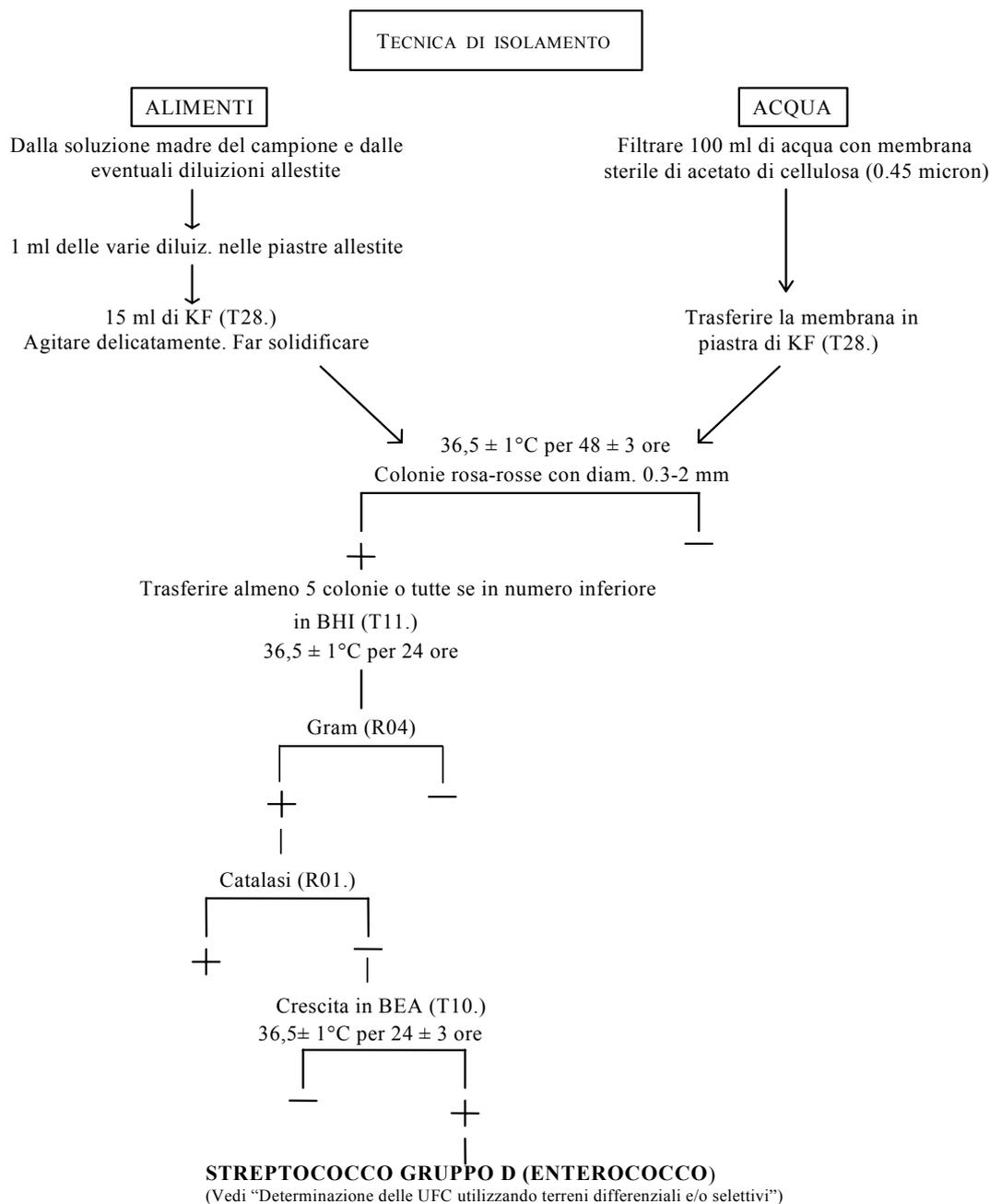
Staphilococcus aureus

CARATTERISTICHE	Gram + Catalasi + Coagulasi + Riduce i nitrati. Non sporigeno. Moderatamente alofilo. Produce alfa beta gamma delta emolisi. Sviluppa 30-37°C (5,6-46°C) pH 7.0-7.5 Aw 0.86-0.87 Produce due tipi di enterotossina termoresistente. Gluc.+ Latt.+ Mann.+
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Incub. 2-4-ore (1-8) nausea, vomito, dolori addominali, prostrazione, raramente diarrea disidratazione, temperatura inferiore alla norma. Durata 1-2 gg.
ALIMENTI	Carni, pesce, salumi, pasticceria, gelato, insaccati



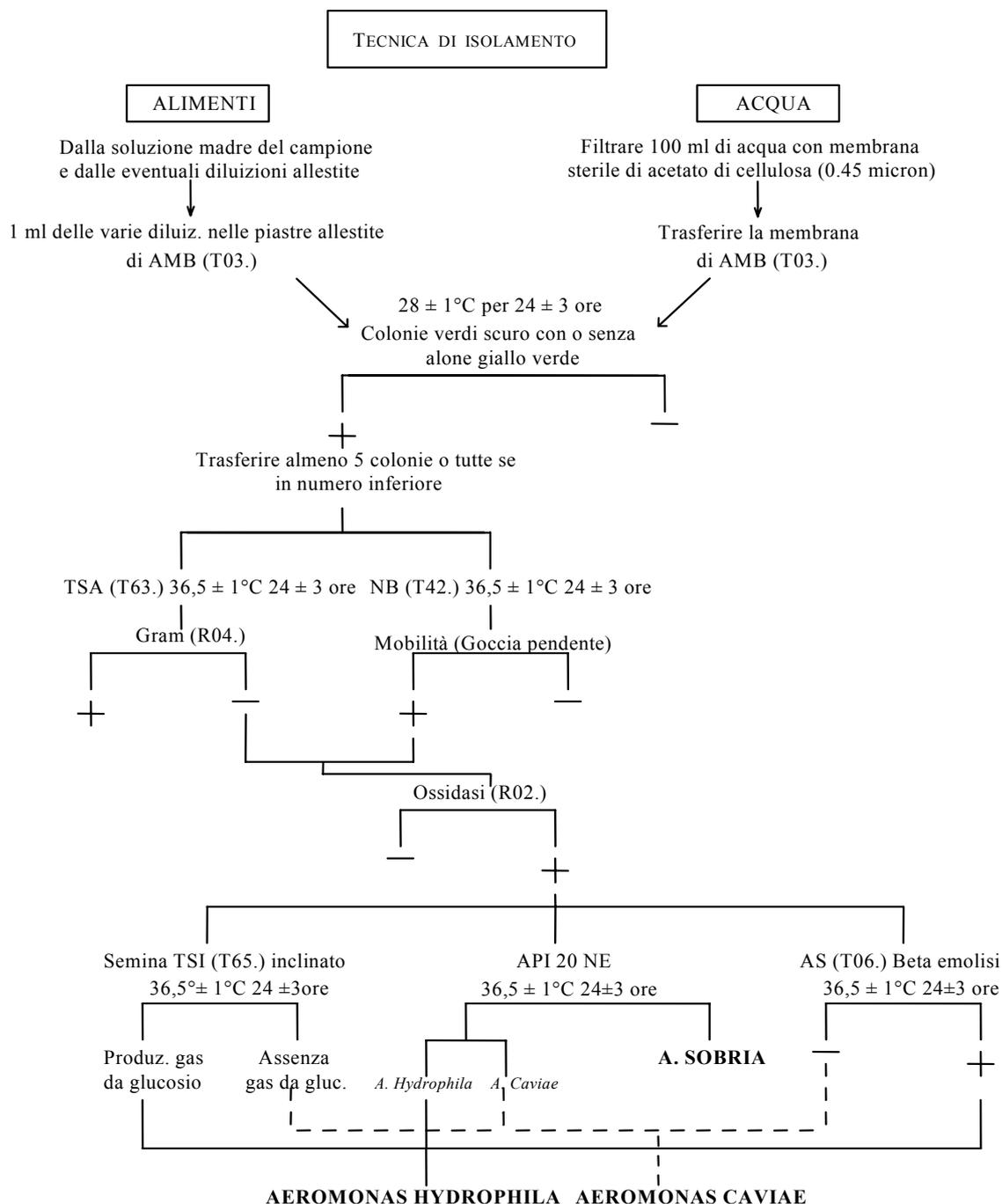
Streptococchi gruppo D (Enterococchi)

CARATTERISTICHE	Genere Enteroc. 4 specie (<i>E.faecium</i> ; <i>E.faecalis</i> ; <i>E.avium</i> ; <i>E. gallinarum</i>). Termoturici 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 glicerolo-tecoici (Ag 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.
ALIMENTI	Prodotti carnei. Salumi. Acqua. Verdure.



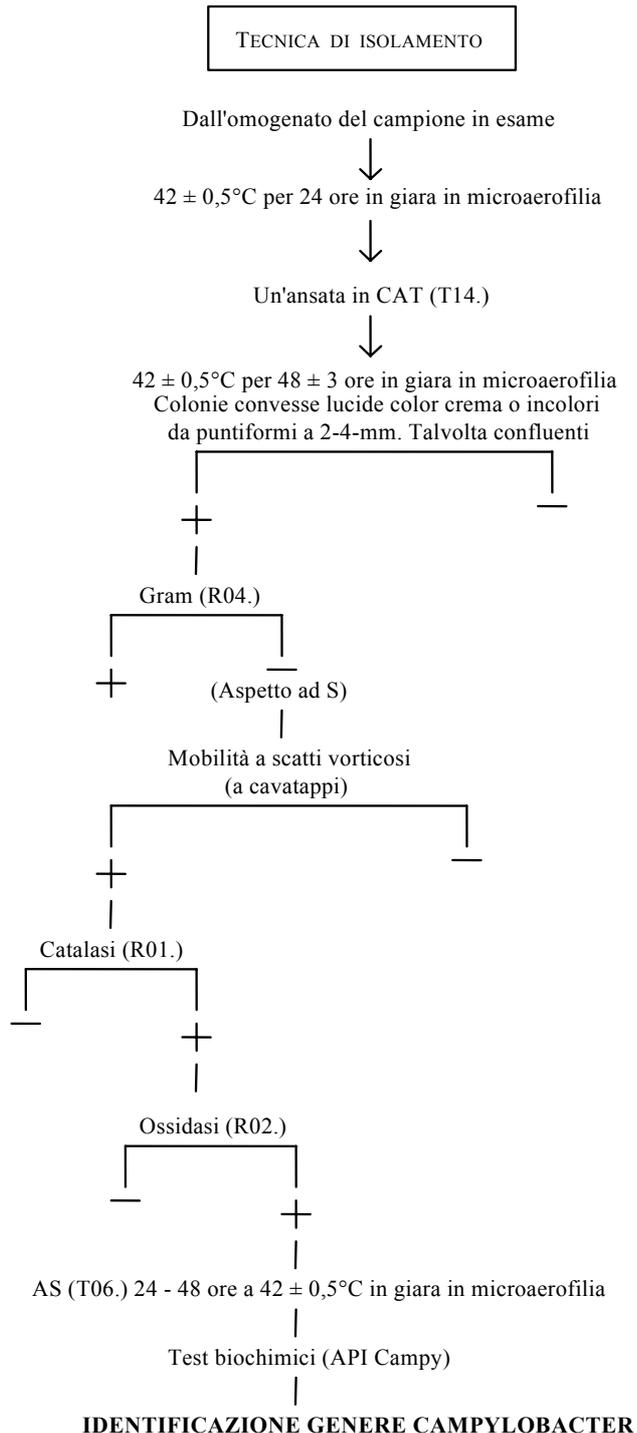
Aeromonas

CARATTERISTICHE	Famiglia Aeromonadaceae (messa in discussione l'appartenenza alla Vibrionaceae). Due gruppi. Per l'uomo interessa il 2° gruppo comprendente <i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. sobria</i> . Anaerobi facolt. Gram - Ossidasi + Catalasi + Indolo + Saccarosio + Mannitolo + . Riducono i nitrati a nitriti. Crescono a temperatura di 28°C, si moltiplicano a temperature di 4-42°C. Non crescono a temperature inferiori a 4°C. In genere sono sale tolleranti (4% NaCl) ma ciò 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 soggetti immunocompromessi.
ALIMENTI	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, in prodotti della pesca (soprattutto molluschi), e in gelati e creme pronte, piatti freddi, maionese.



Campylobacter

CARATTERISTICHE	Bacilli a forma elicoidale o incurvata (ad S o ali di gabbiano). Ne esistono 5 specie con sottospecie. Gram - Ossidasi + Catalasi + (i catalasi - non sono patogeni) Mobili, alosensibili termofili (quelli di interesse pratico) aerobi/microaerofili, non utilizzano i carboidrati nè per via fermentativa nè per via ossidativa. Il <i>C.jejuni/coli</i> cresce a 42°C. Il <i>C.fetus</i> a 25°C.
MANIFESTAZIONI CLINICHE	<i>C.jejuni/coli</i> predomina diarrea profusa ed acquosa maleodorante, dopo 2 - 3 gg talvolta sangue, pus, muco. Ipertermia, mal di testa dolori addominali. Il <i>C.fetus</i> -subspecie fetus provoca forme setticemiche con ipertermia.
ALIMENTI	Latte crudo, carne del pollame.



Vibrio cholerae

CARATTERISTICHE	Gram - di forma incurvata, non sporigeno, mobile, aerobio o anaerobio facoltativo. Cresce optimum 37°C pH 6.8 - 9 concentrazione NaCl 0%-3%. Ossidasi + Gluc.+ Mannitolo + Saccarosio + Inositolo - Lattosio - Arabinosio - Lisina e Ornitina decarbossilasi + arginina deidrase - 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 gg. (solito 2-3 gg)
ALIMENTI	Acqua contaminata. Molluschi

TECNICA DI ISOLAMENTO

25 gr dell'omogenizzato (vedi "Procedura schematica ricerca microrganismi parte II") in 225 ml di AP Alc. (T01.) → 6 - 8 ore a 36,5 ± 1°C

↓
Un'ansata dalla superficie in TCBS (T54.) 36,5 ± 1°C 18-24 ore

↓
Colonie gialle

+ -
↓
TSA (T63.) 36,5 ± 1°C 24 ± 3 ore

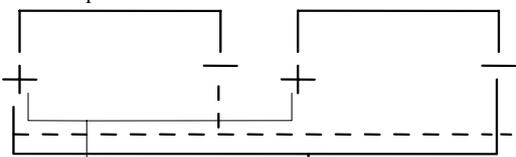
↓
Ossidasi (R02.)

- +
↓

TSI (T63.) 36,5 ± 1°C 24 ore

+ -
↓
H₂S - Gas - Gluc +

Siero polivalente Soluzione fisiologica (R07.)



Ceppo autoaggl. Fare altro passaggio e riprovare

Prove biochimiche API 20 NE

↓
SIEROTIPO

Sieri monospecifici

anti OGAWA (Ag AB in Mim.parte C) anti INABA (Ag AC)

BIOTIPO	Polimixina B	Emoagg	Emolisi	Fago IV Classico
V. Cholerae	Sen.	-	-	Sen.
V. El Tor	Res.	+	+	Res.

Se il ceppo presenta caratteri della specie V. Cholerae ma non agglutina anti-siero 0-1 esistono tre possibilità.

FORME R

Ag termolab. R in tutti i sierotipi Identif. con antisiero, ma impos. conoscere il sierotipo a cui appartiene la corr. forma S

CEPPI MUCOIDI

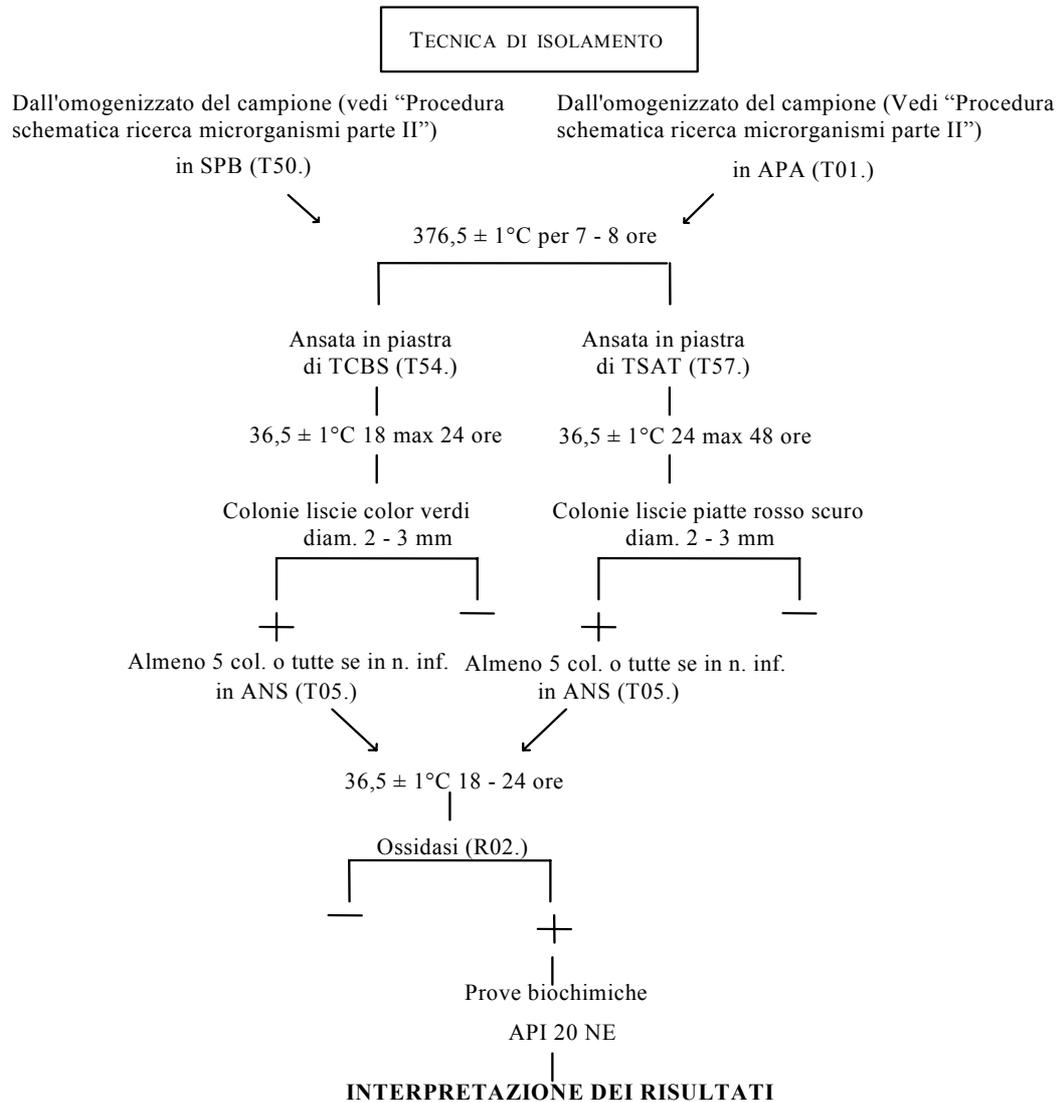
Ceppo mucoide, Ag termolab. maschera Ag somatici. Bollire il ceppo 2-3-ore e ric. siero agglu.

V. CHOLERAЕ NAG

Ceppo NAG non aggl. antis.0-1 nemmeno forme S. Identificabile "V. Cholerae NAG" se non aggl. antis.0-1 nè antis.R nemmeno dopo ebolliz. a 100°C per 2 ore

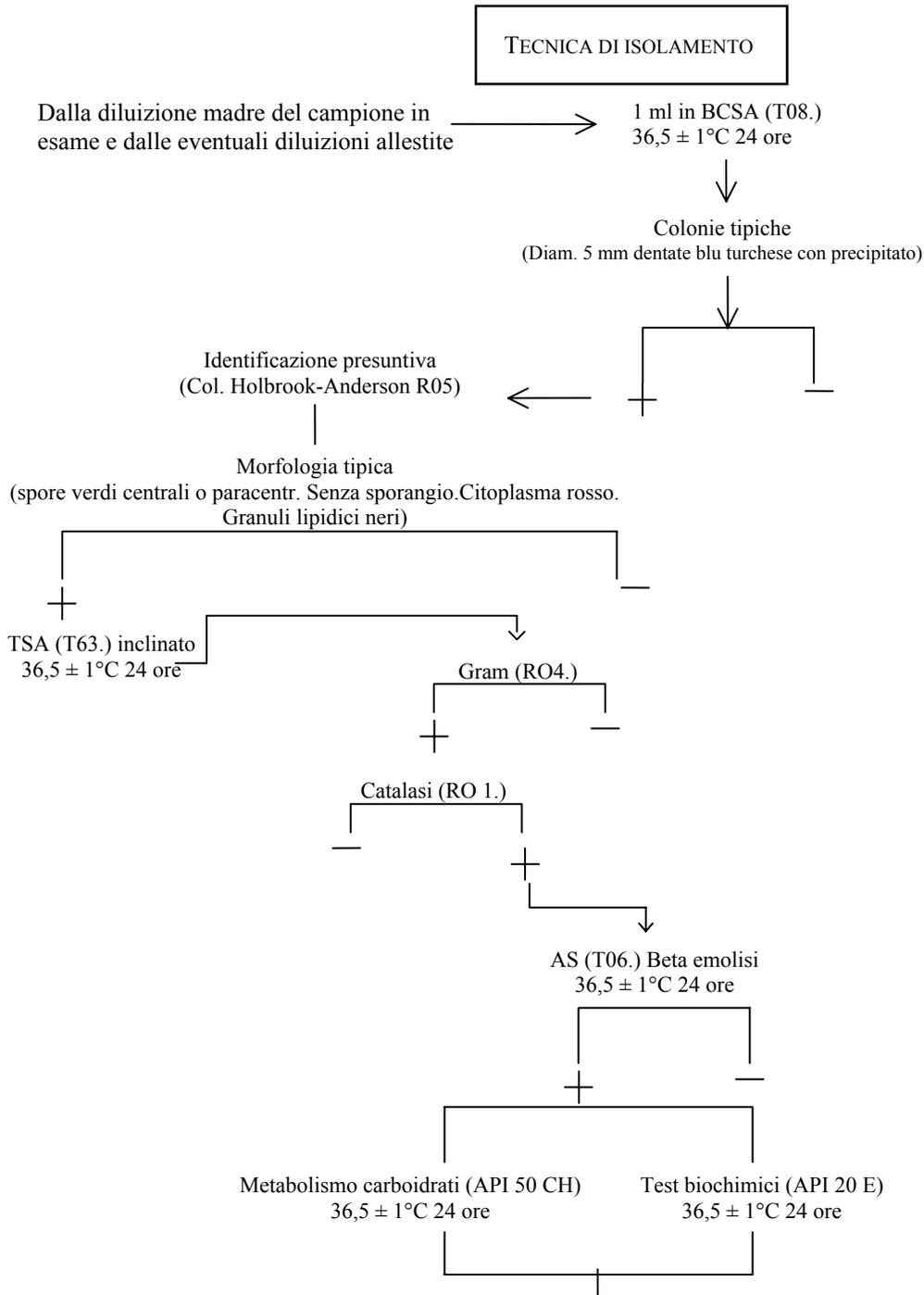
Vibrio parahaemolyticus

CARATTERISTICHE	Gram - Ossidasi + Lattosio - Mannitolo + Maltosio + Lisina e ornitina decarbossilasi + Arginina deidrolasi - Arabinosio + (-) Alofilo
MANIFESTAZIONI CLINICHE	Incubazione 12-24 ore. Dolori addominali, vomito, diarrea, disidratazione, febbre. Durata della malattia 1 - 7 giorni.
ALIMENTI	Prodotti ittici crudi e cotti. Pesci, molluschi, acque.



Bacillus cereus

CARATTERISTICHE	Gram + Catalasi + Gluc.+ Malt.+ Glic.+ Mannit.- Latt.- Arab.- mobile anaerobio facol. Riduce i nitrati, liquefà la gelatina. Emolitico Aw 0.93-0.95 pH 4.3-9.3 temp.18 - 43°C (esistono psicrofili). 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.
ALIMENTI	Insalate, purè, minestre di verdure, riso.



Interpretazione dei risultati. Identificazione del bacillus genere
(Vedi "Determinazione delle UFC utilizzando terreni differenziali e/o selettivi")

Listeria monocytogenes

CARATTERISTICHE

Catalasi + Gram + aerobio non sporigeno mobile. Produce beta emolisina
Mannitolo - Xilosio - Ramnosio + Non idrolizzano l'urea non produc. H₂S in TSI
Ossidasi - Temp. 30-37°C (1-45°C) pH 6-9 (pH inf. 5,5 non sopravvive)

MANIFESTAZIONI CLINICHE

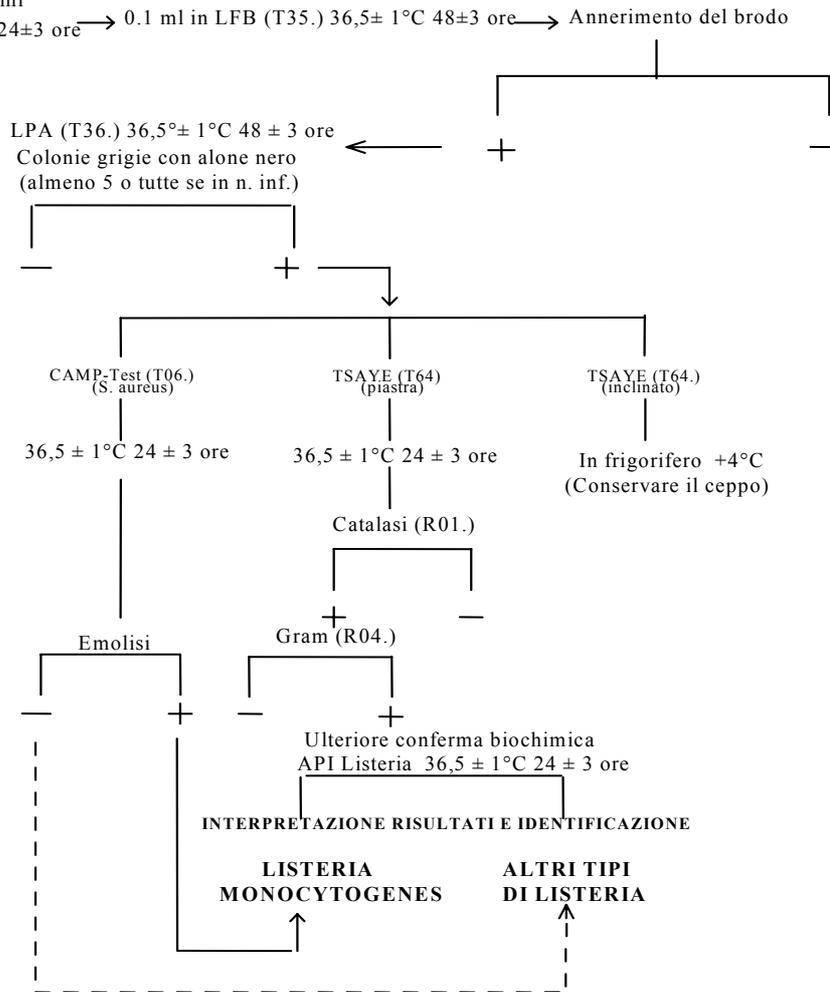
Sintomatologia simile all'influenza, disturbi cerebrali talvolta accompagnati da setticemia. Pericolosa per donne gravide.

ALIMENTI

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

TECNICA DI ISOLAMENTO

25 gr del campione in 275 ml di LEB (T34.) 36,5 ± 1°C 24±3 ore

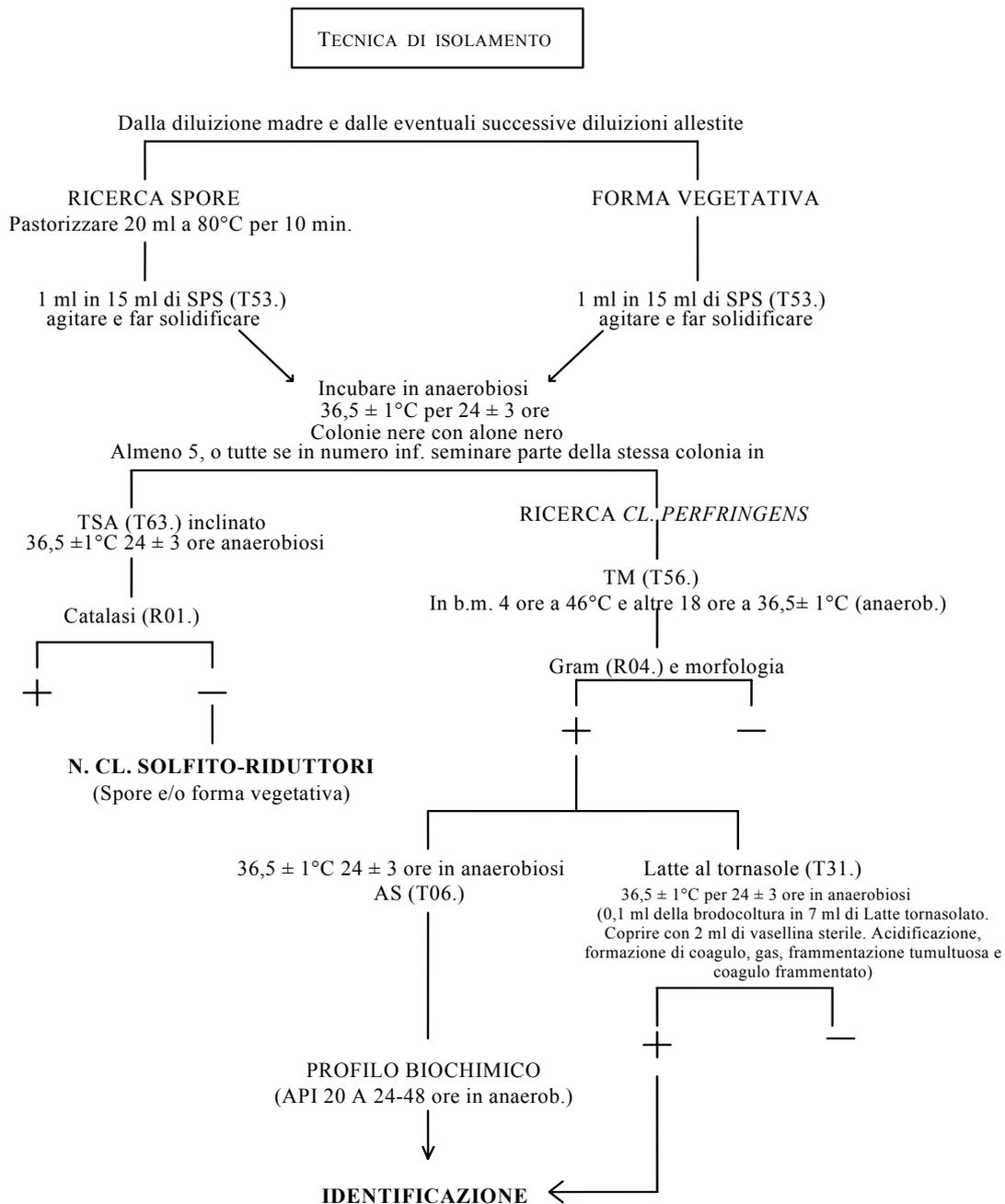


Clostridi solfito - riduttori

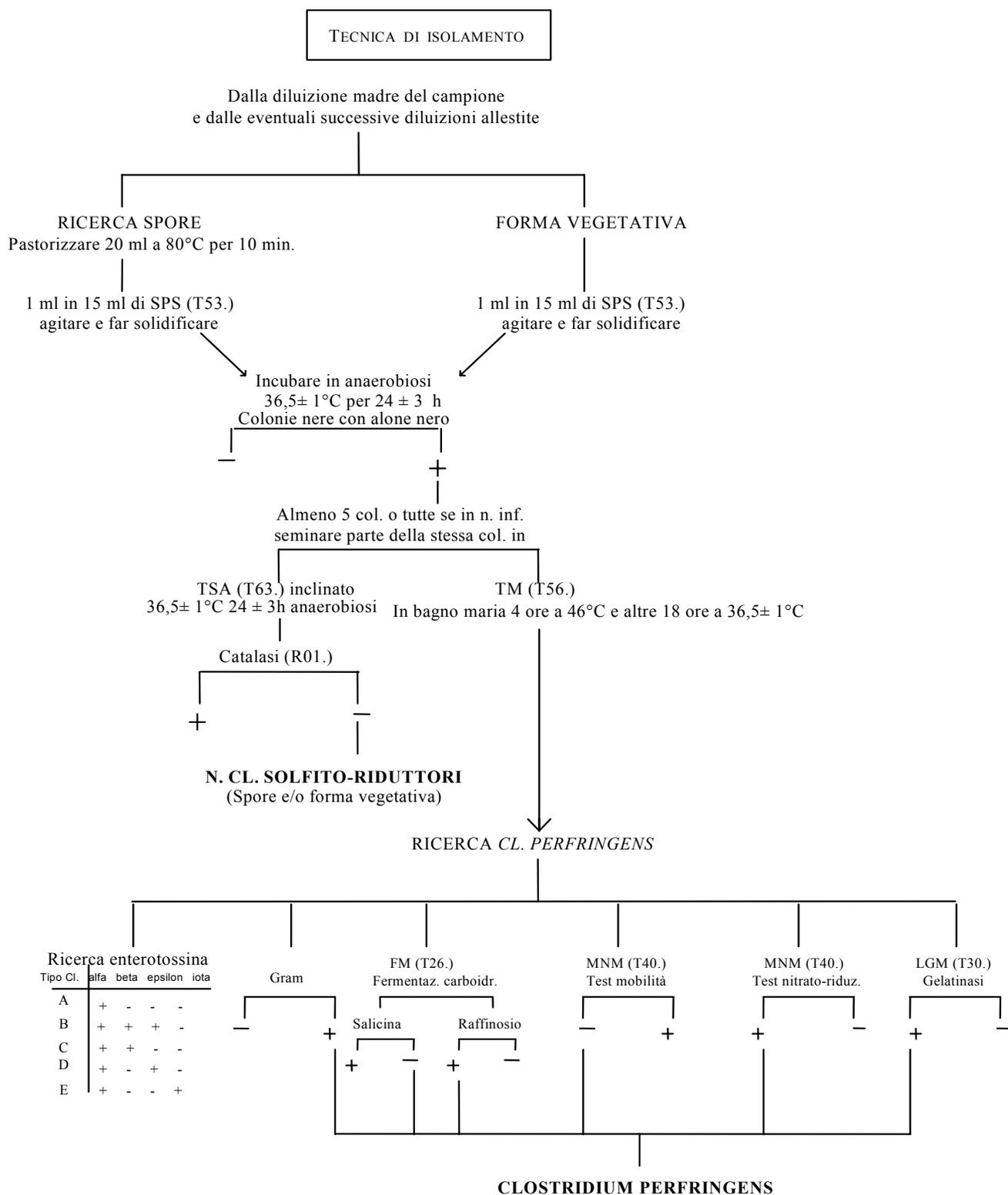
(*Clostridium perfringens*)

Metodica - A

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 pubblica. 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 addominali, talvolta vomito, non febbre.
ALIMENTI	Larga diffusione: carni, pollame, semiconservati, selvaggina.

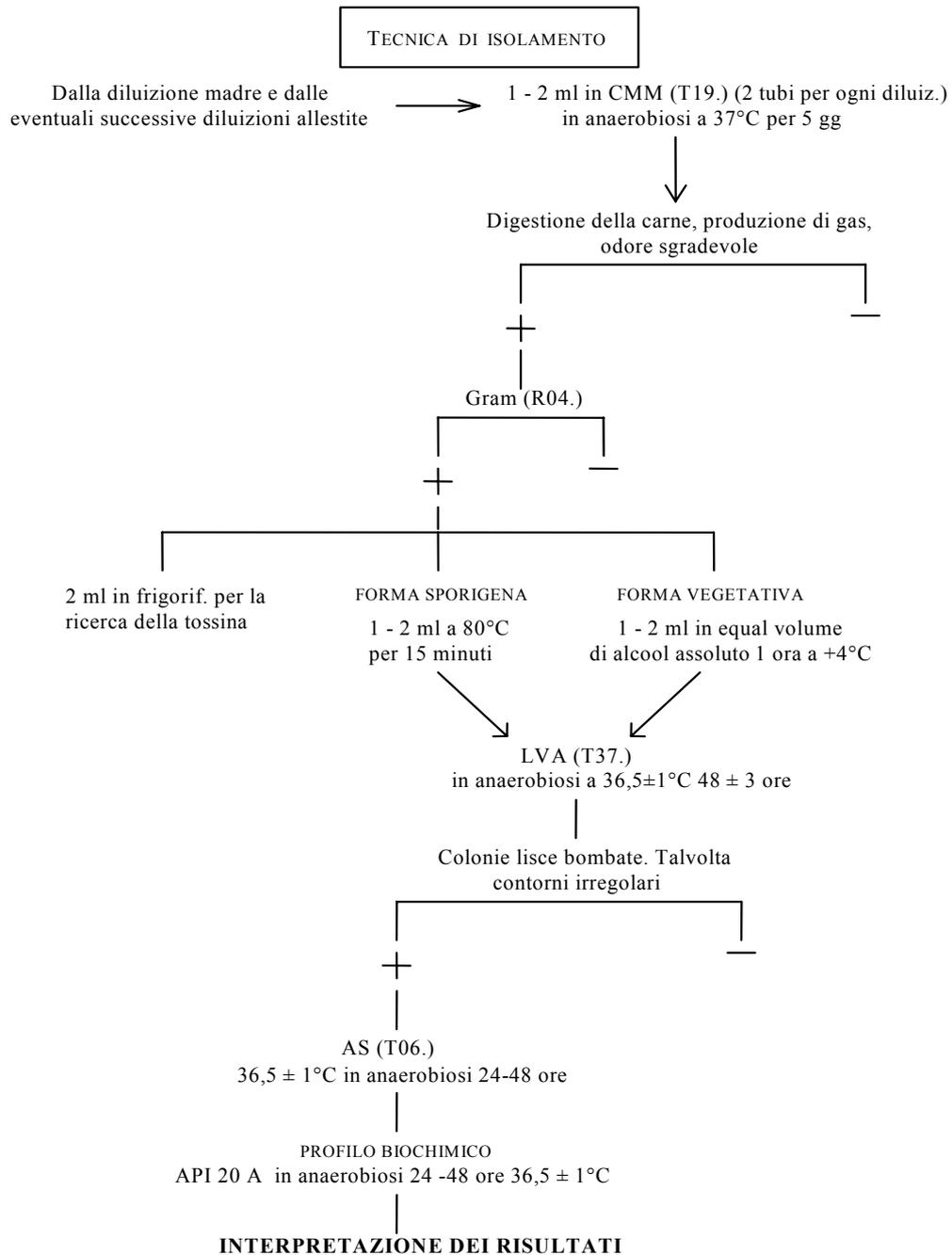


Metodica - B

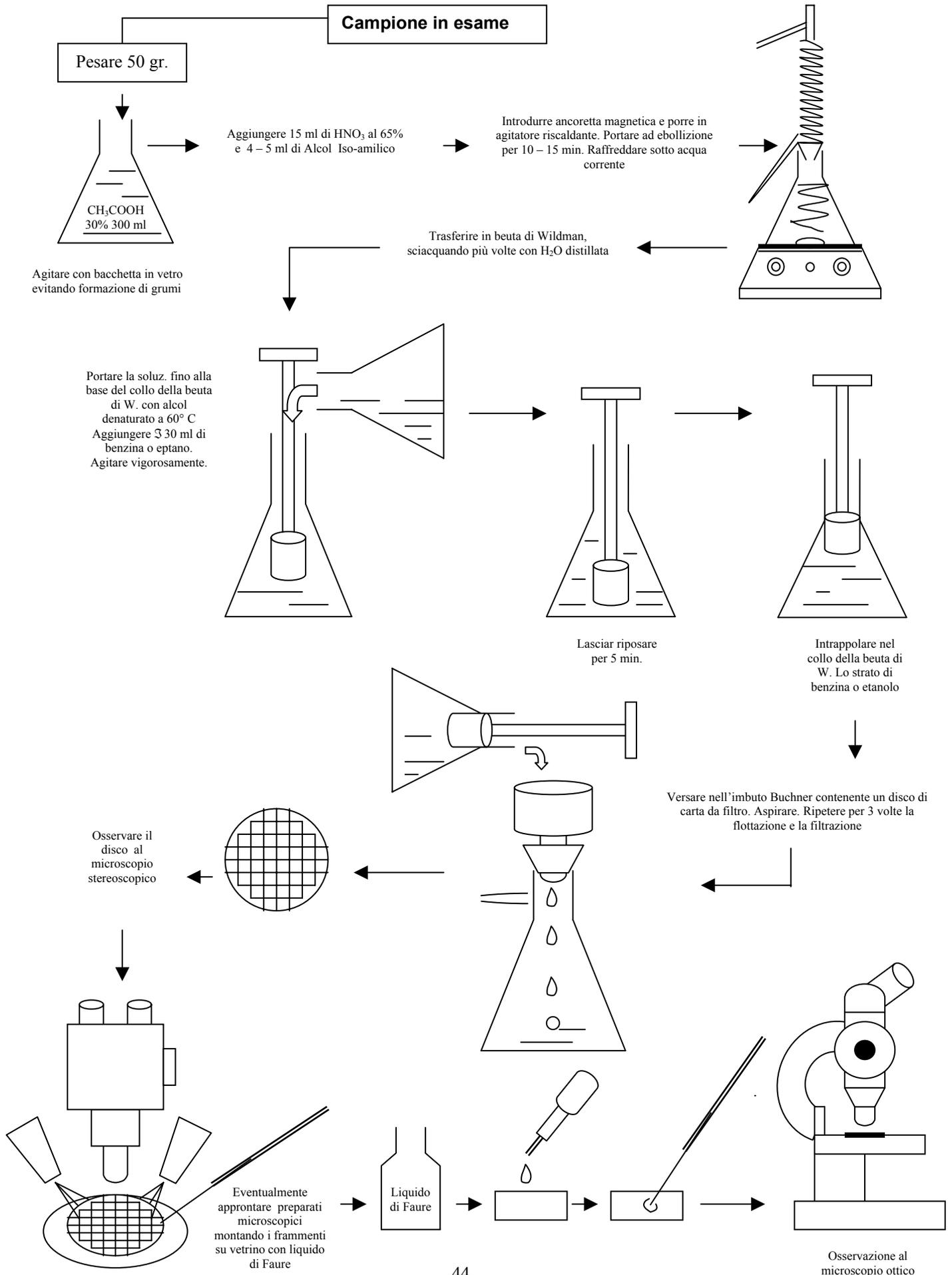


Clostridium botulinum

CARATTERISTICHE	<p>Il <i>Cl. botulinum</i> corrisponde più a un consorzio di specie che a una specie tassonomicamente definita. Produce neurotossine dall'azione paralizzante immunologic. differenti ma dallo stesso effetto (<i>Cl. barati</i> e <i>Cl. butyricum</i> produce tossine botuliniche). Tutti i tipi sviluppano a 37°C con pH prossimo alla neutralità non cresce a pH inf. 4.5 (4.6- 8.3) la tossina è termolabile (80-100°C per 30 min.) distrutta a 100°C.</p> <p>Lo sviluppo e la produzione di tossina varia può avvenire a temperatura e a concentrazione di Aw e di NaCl a secondo del tipo.</p>
MANIFESTAZIONI CLINICHE	<p>Incubazione 18-36 ore max 8 gg. 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.</p>
ALIMENTI	<p>Carni, conserve (soprattutto a produzione familiare) verdure, prosciutti affumicati o salati, (preparazione artigianale). Il B. di tipo E è legato al consumo di pesce (botulismo da pesce).</p>



Filth - test sfarinati e prodotti di trasformazione



Lieviti e muffe

CARATTERISTICHE

I miceti hanno dimensioni maggiori 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 delle 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 unicellulare o filamentoso è detto tallo, e si origina sempre da una spora. La spora si riproduce per via sessuale, asessuale o vegetativa.

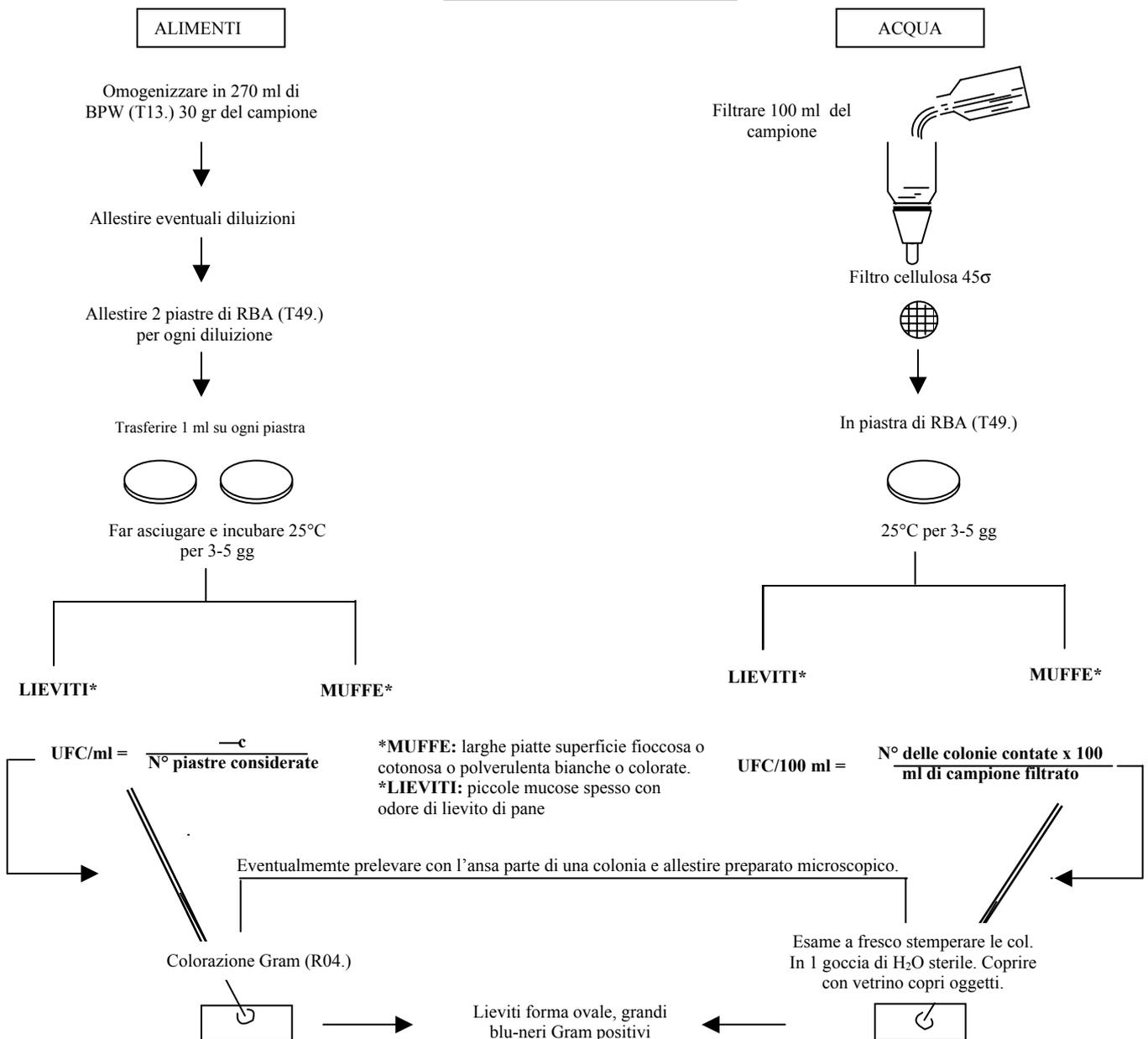
MANIFESTAZIONI CLINICHE

I miceti sono responsabili di micosi superficiali (tinea o pitiriasi versicolor), cutanee (tigne o tricofizie), sottocutanee (sporotricosi) e sistemiche (blastomicosi). Tra i lievitifirmi 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, della sua conservazione e dei processi di produzione. Comunque cariche elevate di miceti possono deteriorare l'alimento.

HABITAT

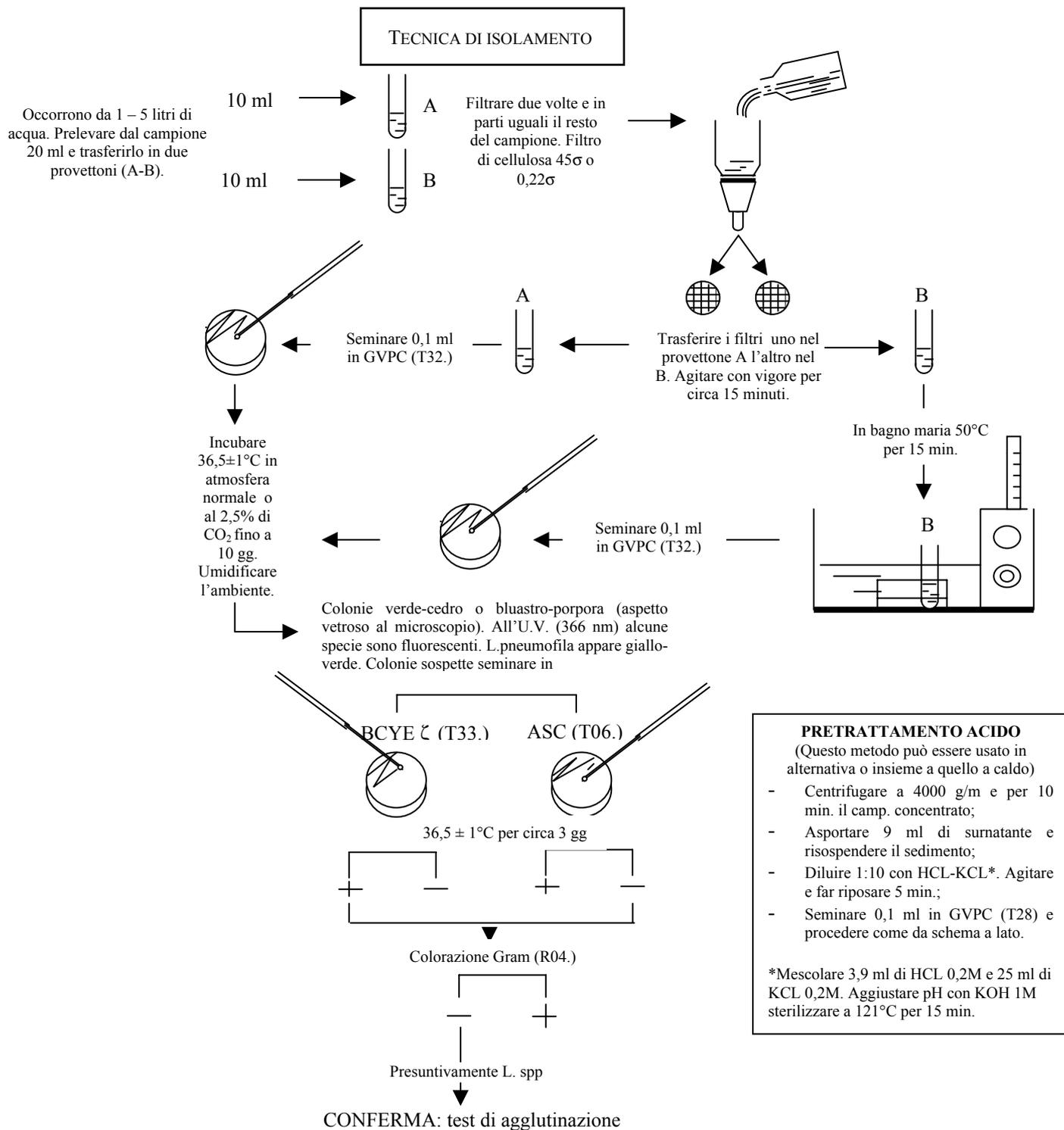
Presenti in terreni e materie prime crescono anche in condizioni estreme, quali basse temperature, elevata acidità, scarsità di acqua. I lieviti si ritrovano anche in ambienti acquatici e la spora fungina può vivere anni in condizioni sfavorevoli.

TECNICA DI ISOLAMENTO

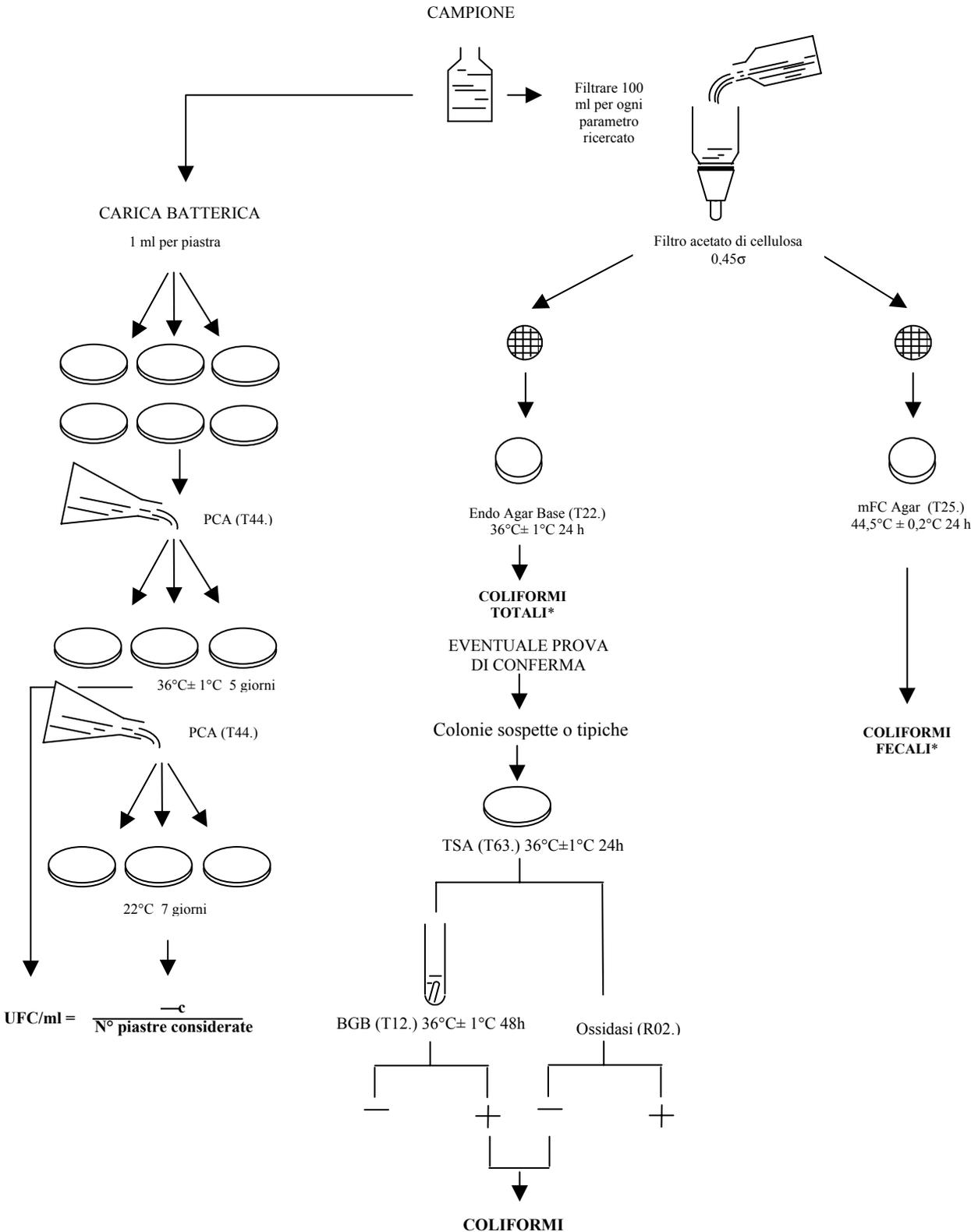


Legionella pneumophila

CARATTERISTICHE	Conosciuti 6 diversi serotipi e 22 specie tra cui: <i>L.micdadei</i> , <i>L. bazemanii</i> ; <i>L.durnoffii</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 altri organi oltre al polmone. 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 interumana, comunque è bene evitare contatti attraverso l’apparato respiratorio.



Ricerca carica batterica a 36 ± 1°C - 22°C coliformi totali e fecali nelle acque ad uso potabile



*UFC/100 ml =
$$\frac{N^{\circ} \text{ delle colonie contate} \times 100}{\text{ml di campione filtrato}}$$

Coliformi totali e fecali
(Acque destinate al consumo umano. Metodo MPN/100 ml)

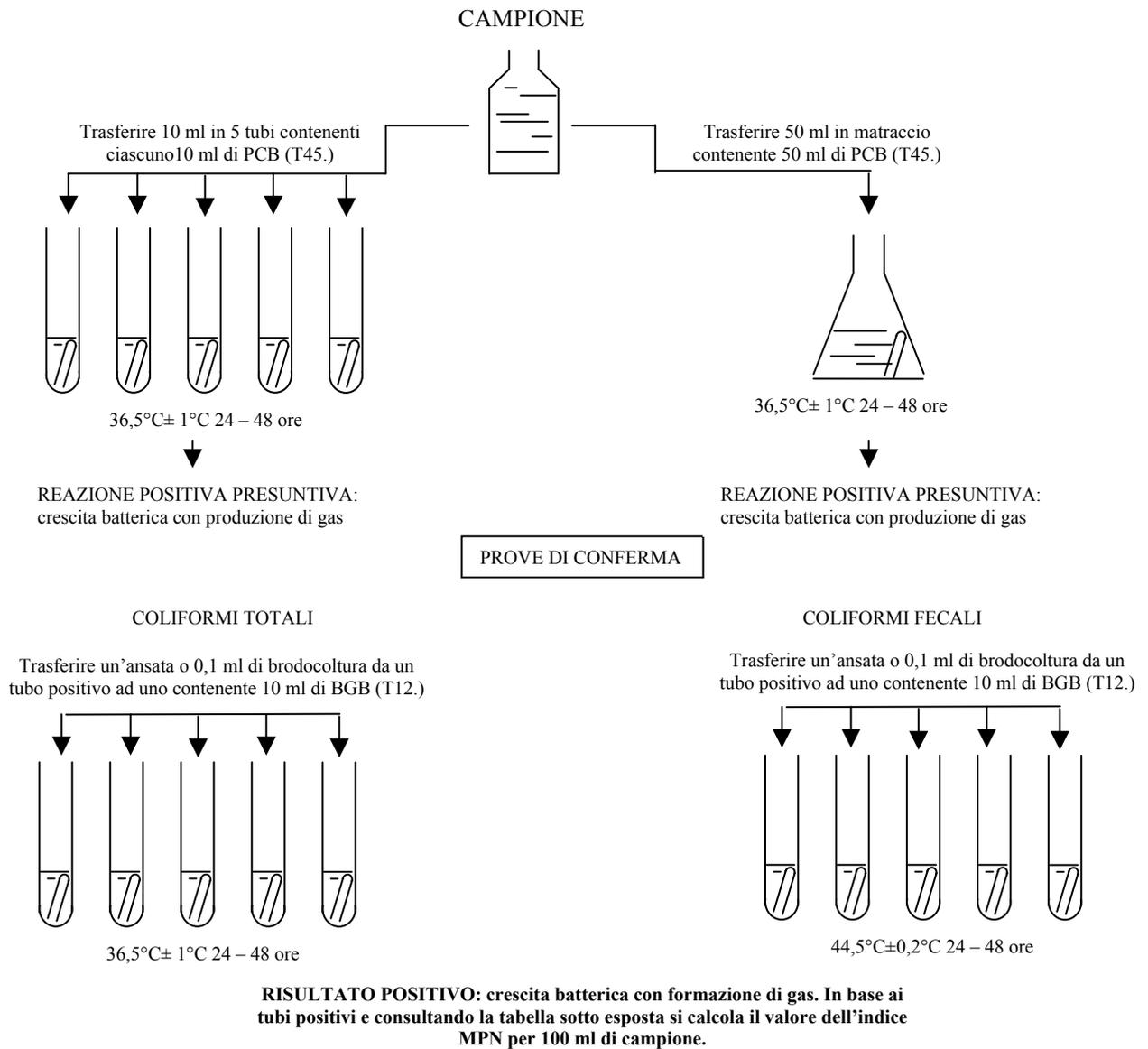
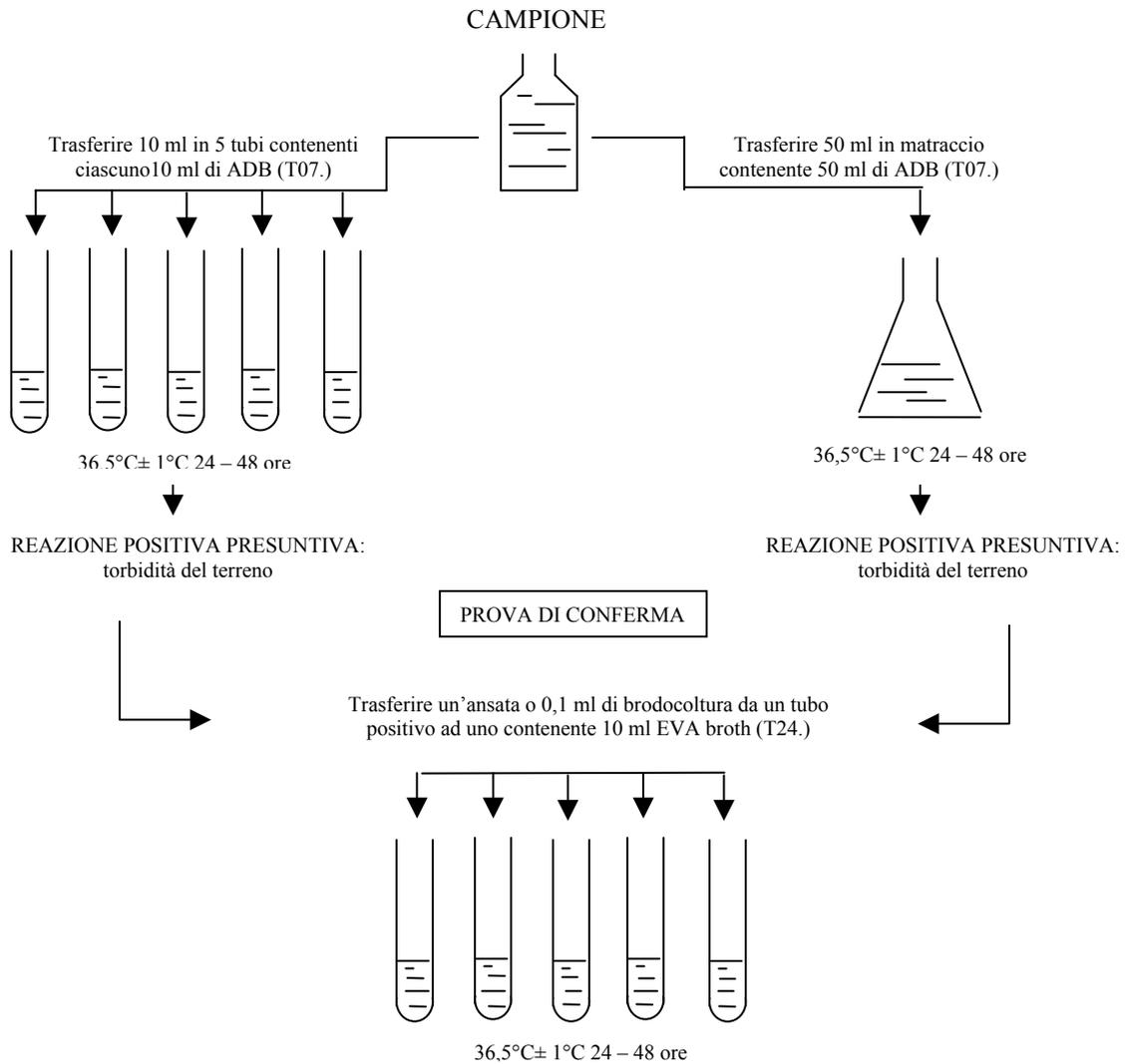


TABELLA PER IL CALCOLO DEL NUMERO PIU' PROBABILE

N° DI TUBI POSITIVI		
50 ml di acqua seminata per ogni beuta	10 ml di acqua seminata per ogni tubo	N° più probabile / 100 ml di campione
0	0	0
0	1	1
0	2	2
0	3	4
0	4	5
0	5	7
1	0	2
1	1	3
1	2	6
1	3	9
1	4	16
1	5	16

Streptococchi fecali
(Acque destinate al consumo umano. Metodo MPN/100 ml)



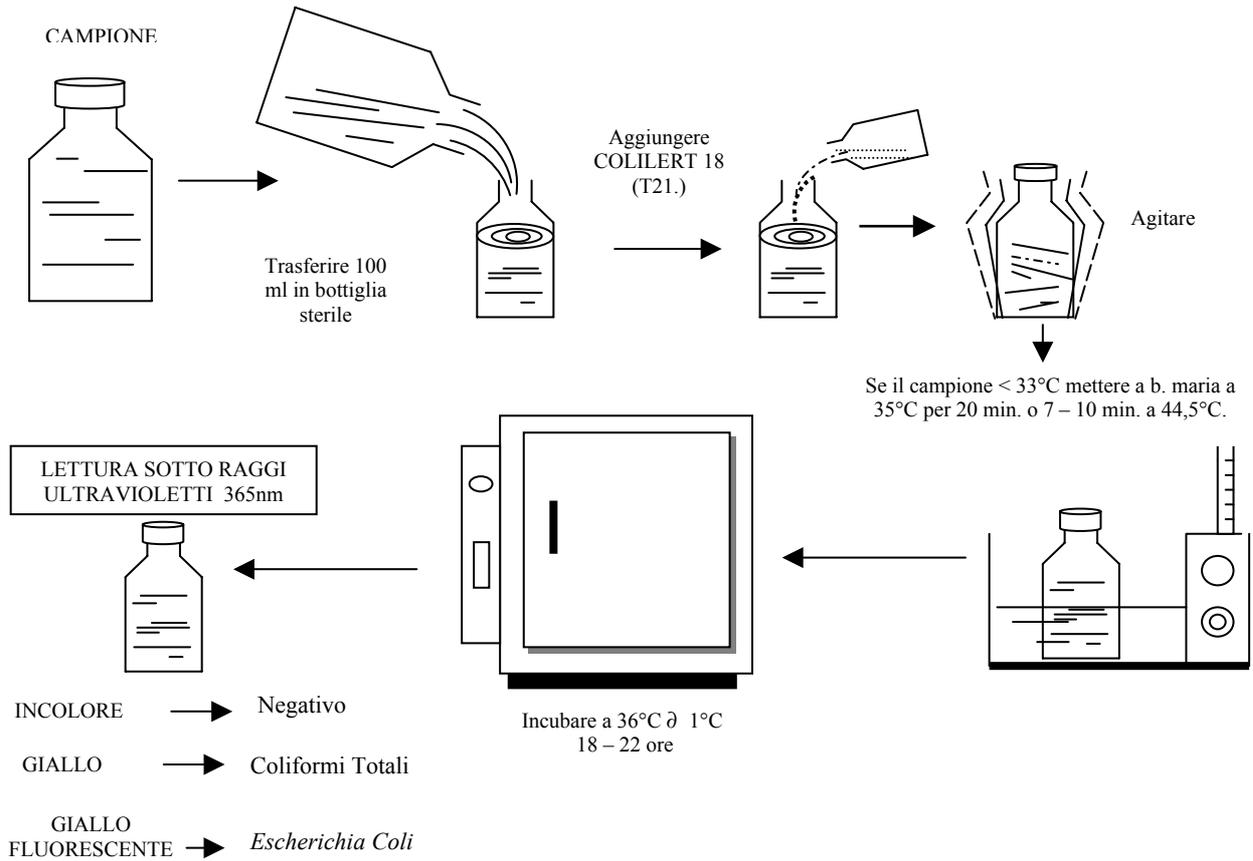
RISULTATO POSITIVO: intorbidamento del terreno con deposito grigio. In base ai tubi positivi e consultando la tabella sotto esposta si calcola il valore dell'indice MPN per 100 ml di campione.

TABELLA PER IL CALCOLO DEL NUMERO PIU' PROBABILE

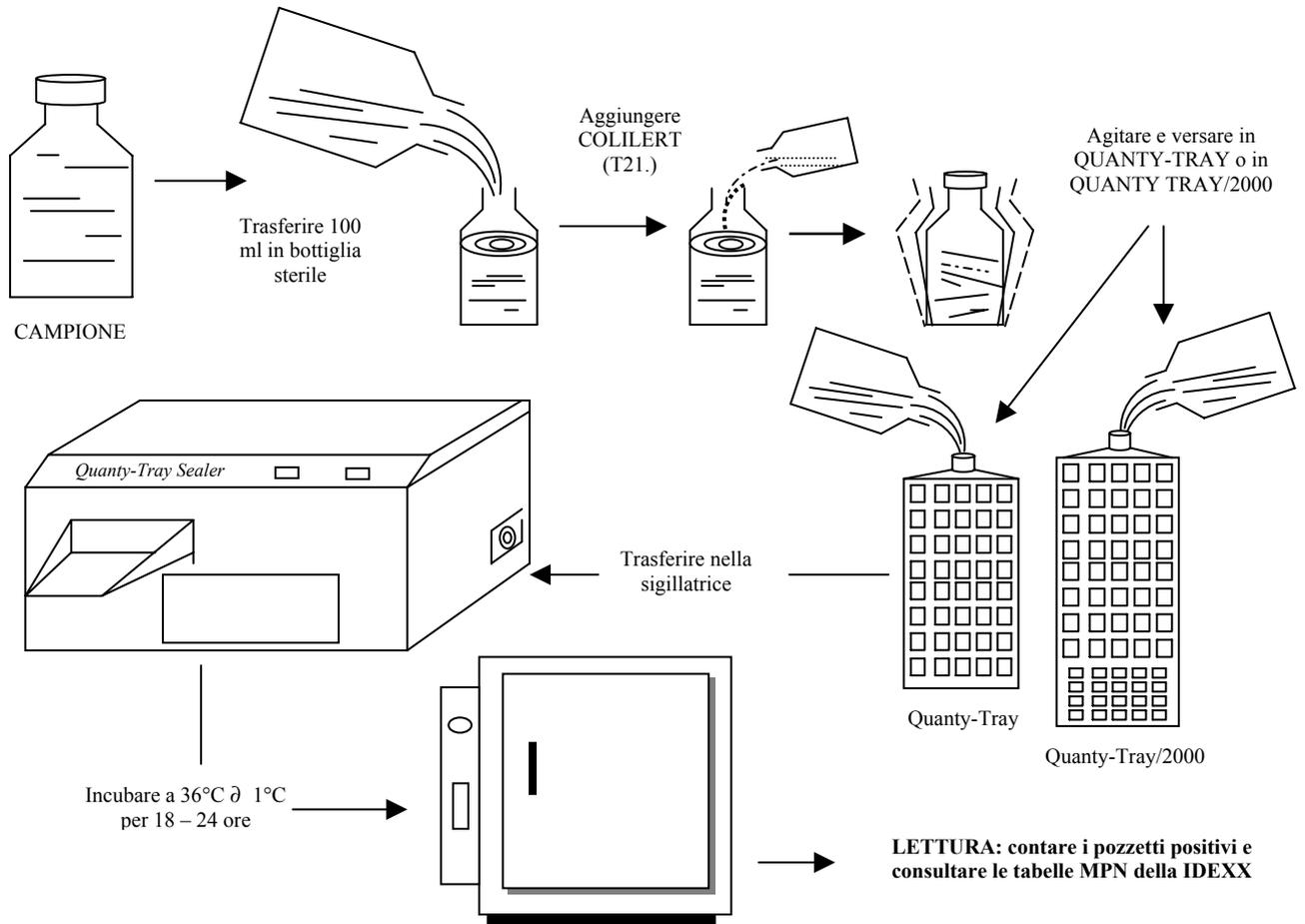
N° DI TUBI POSITIVI		
50 ml di acqua seminata per ogni beuta	10 ml di acqua seminata per ogni tubo	N° più probabile / 100 ml di campione
0	0	0
0	1	1
0	2	2
0	3	4
0	4	5
0	5	7
1	0	2
1	1	3
1	2	6
1	3	9
1	4	16
1	5	}16

Coliformi totali ed escherichia coli nelle acque ad uso potabile (COLILERT)

COLILERT 18 – Metodo qualitativo: Presenza / Assenza

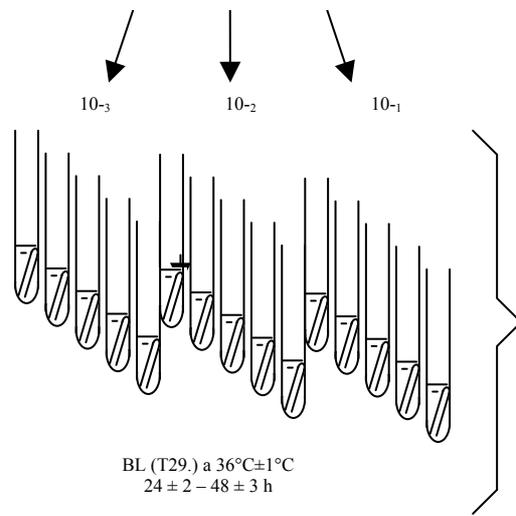


Metodo qualitativo: Quanti-Tray e Quanti –Tray/2000

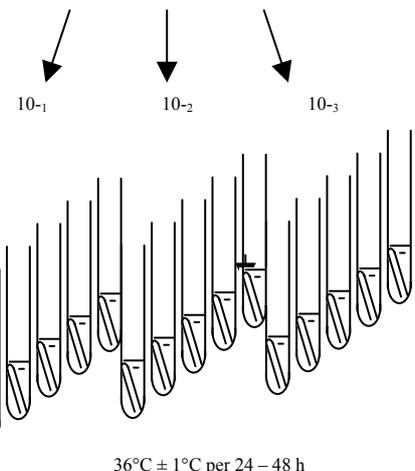


Coliformi totali
(Numero più probabile – Metodo MPN APAT-IRSA-CNR 7010 Man. 29/2003)

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



PROVA DI CONFERMA



Tubi con crescita batterica e produzione di gas trasferire 0,1 ml in BGB (T12.)

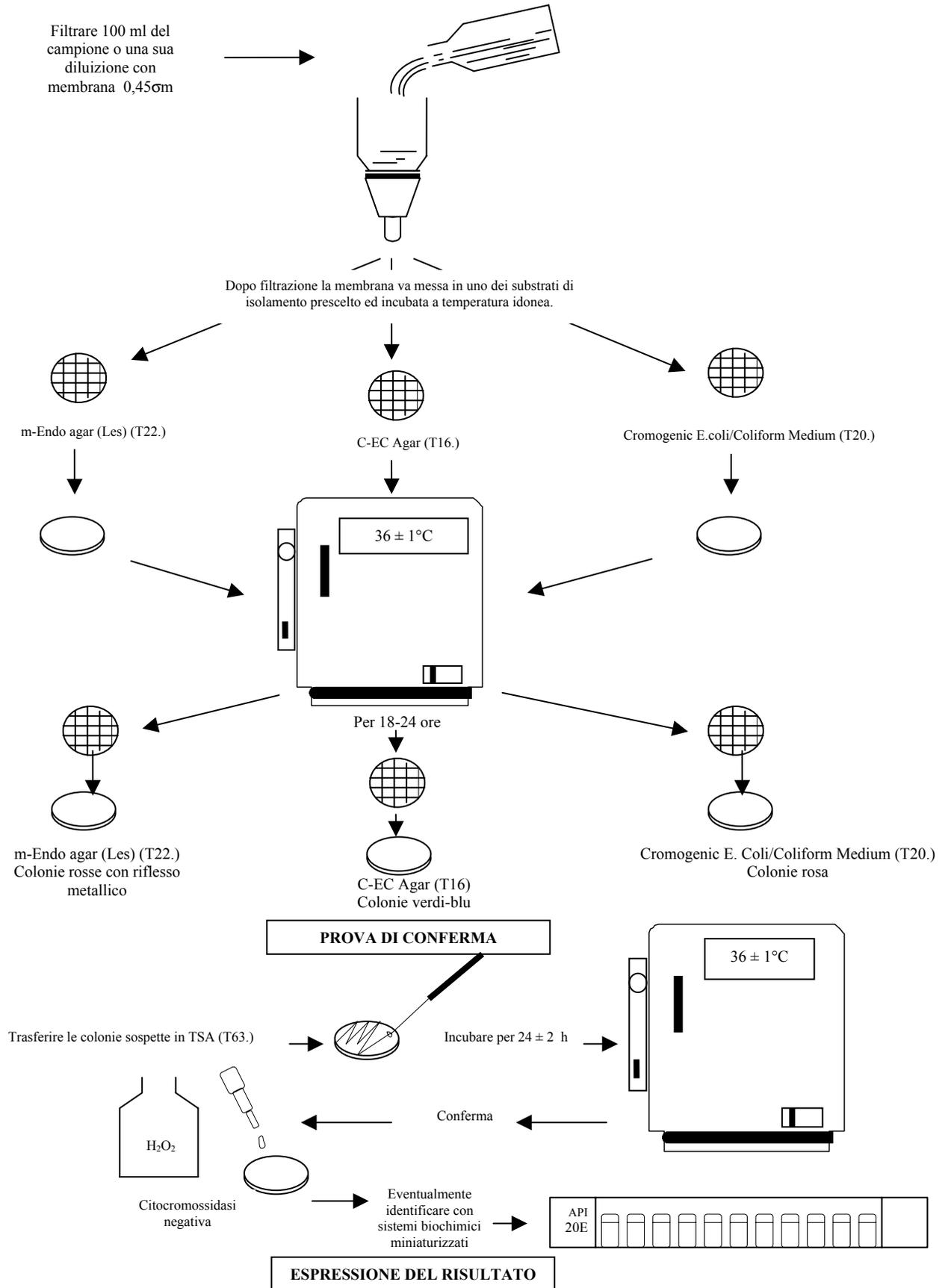
Tubi positivi (torpidità e gas) calcolare il valore dell'indice MPN riferito a 100 ml sulla base delle combinazioni ottenute consultando la tabella sotto riportata

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

N. pos.	3 tubi	Conf. inf	Conf. sup	5 tubi	Conf. inf	Conf. sup	N. pos.	3 tubi	Conf. inf	Conf. sup	5 tubi	Conf. inf	Conf. sup
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	36	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	>1100						4-0-0				13	3	31
4-0-1				17	5	46	4-1-0				17	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									

Mac Crady M.H., *Tables for rapid interpretation for fermentation-tube result*, publ. Health J., 9, 201-204, 1918

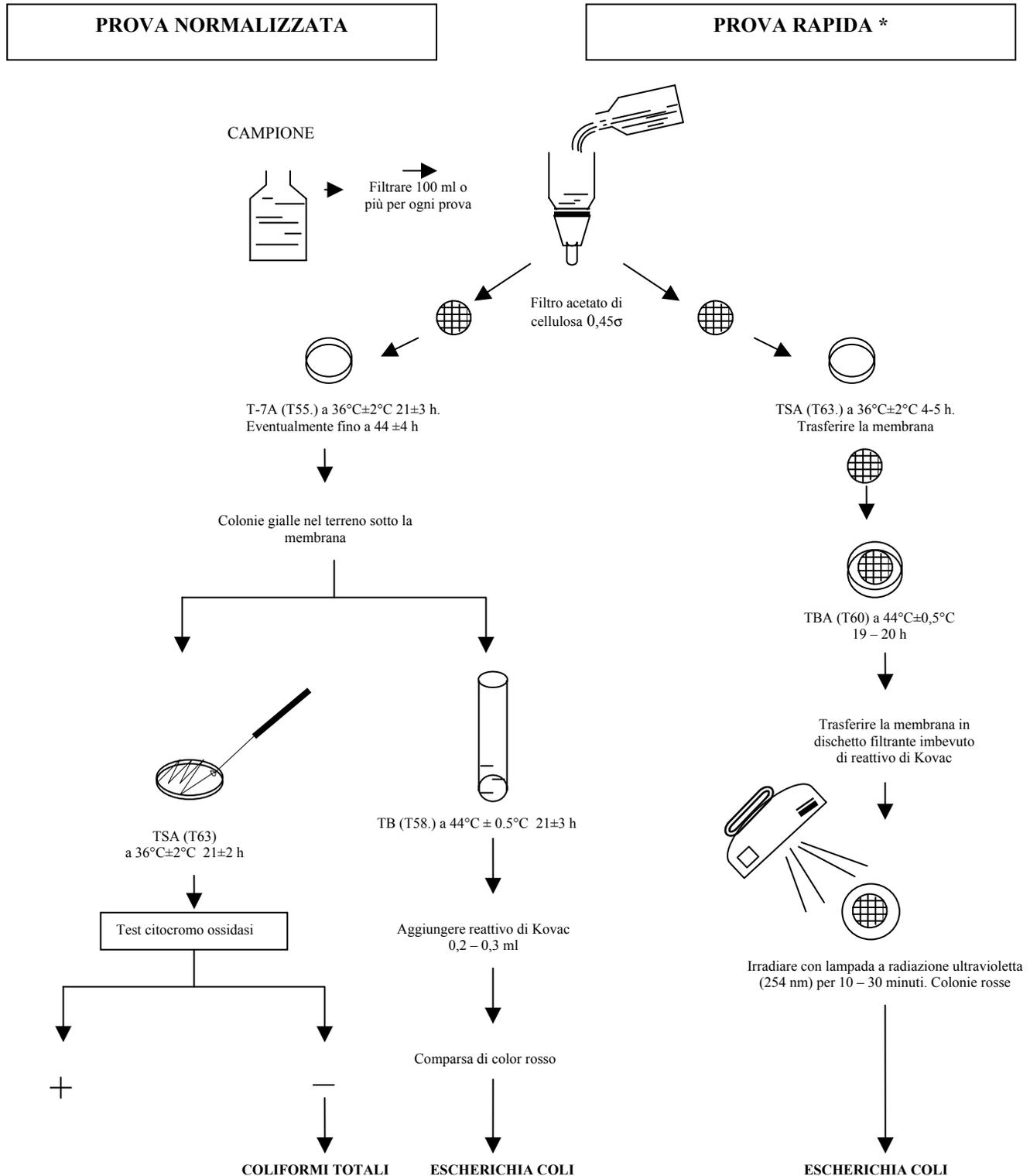
Coliformi totali – Metodo membrane filtranti (MF)
(APAT – IRSA - CNR 7010 Man. 29/2003)



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

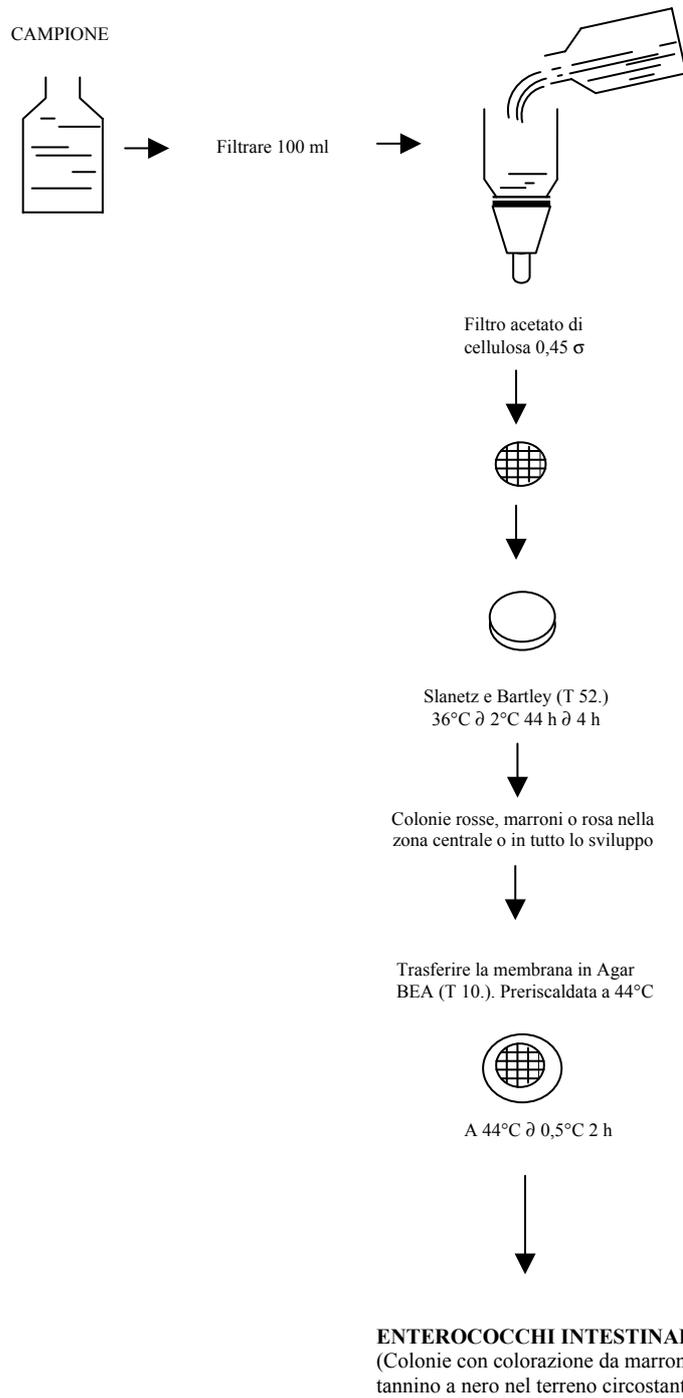
Dove:
 C = n. di colonie confermate per 100 ml
 A = n. di colonie confermate
 B = n. di colonie da sottoporre a conferma
 N = n. di colonie caratteristiche contate
 V_i = volume (ml) di campione analizzato
 V_s = volume di riferimento per i risultati (100 ml)
 F = fattore di diluizione

Coliformi totali – *Escherichia coli*
(Acque per uso umano metodo membrane filtranti MF – UNI EN ISO 9308-1)

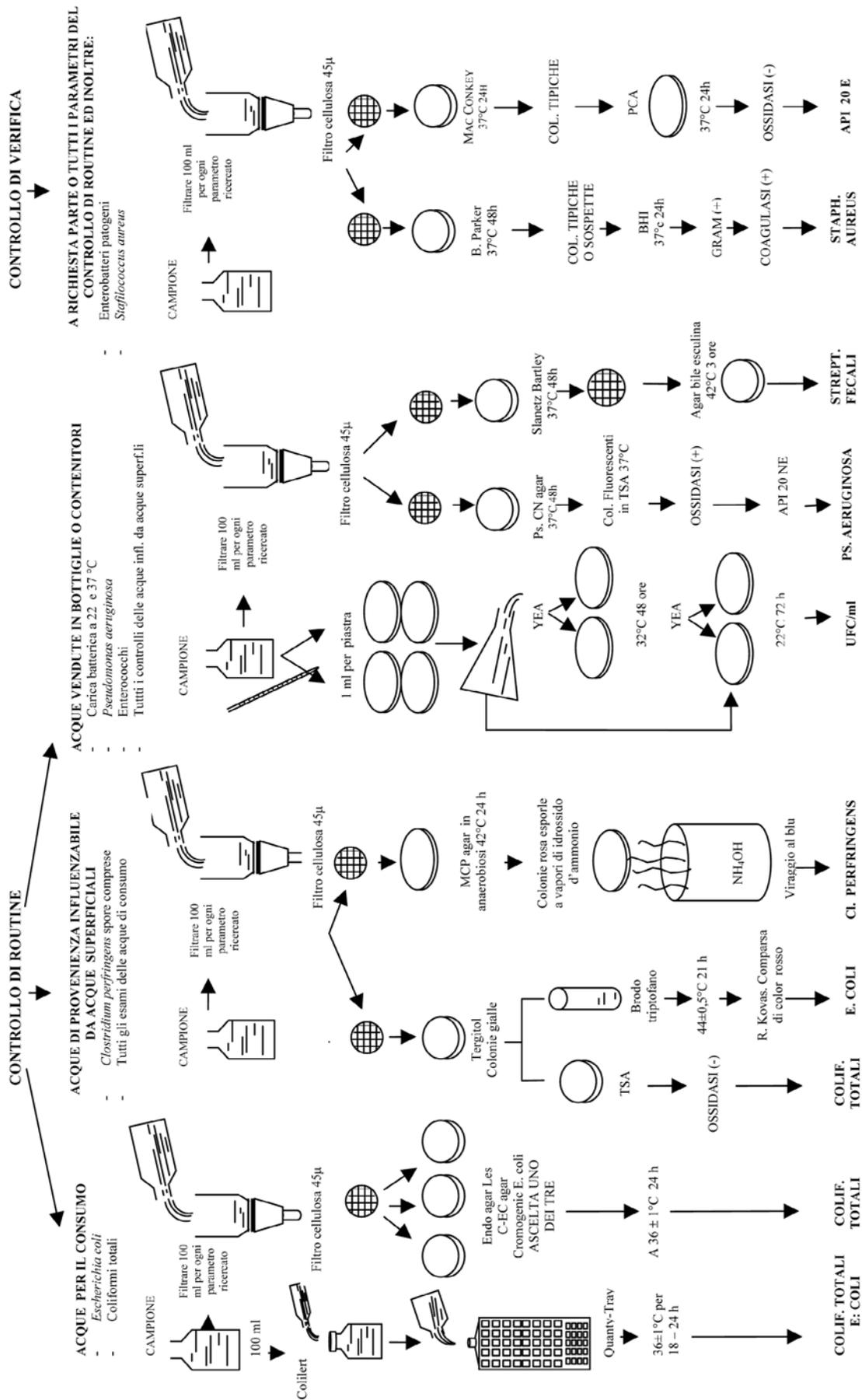


* NB: La prova normalizzata ha una bassa selettività e la prova rapida può essere necessaria quando si richiede una risposta più urgente. Le prove comunque possono essere allestite in parallelo, in questo caso il risultato finale per l'*Escherichia coli* deve essere il più alto dei due.

Ricerca e conteggio di Enterococchi intestinali
(Metodo su membrana filtrante MF – UNI EN ISO 7899-2)



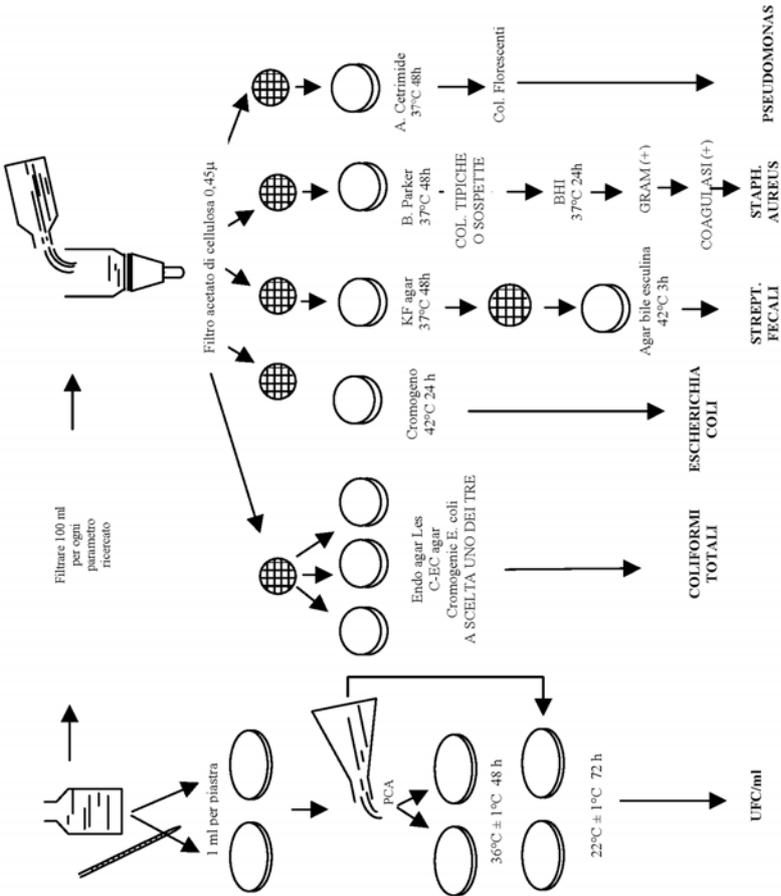
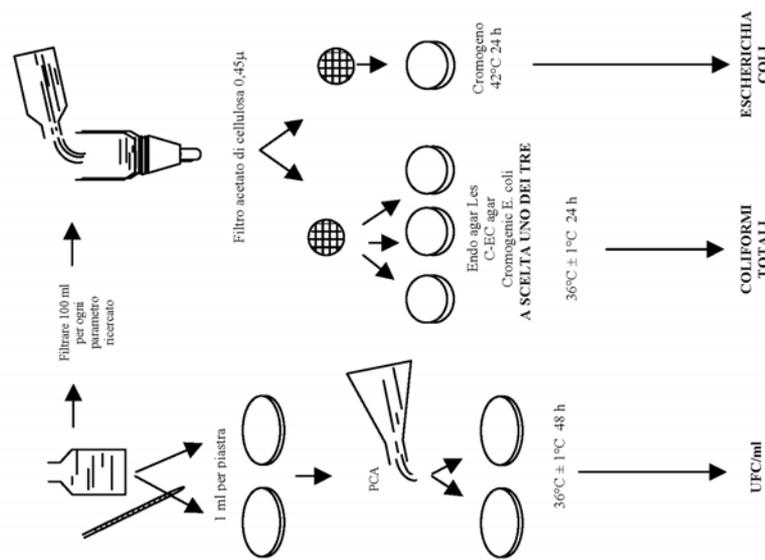
Analisi delle acque destinate al consumo umano Parametri microbiologici da determinare (D. Lgs n.31/01)



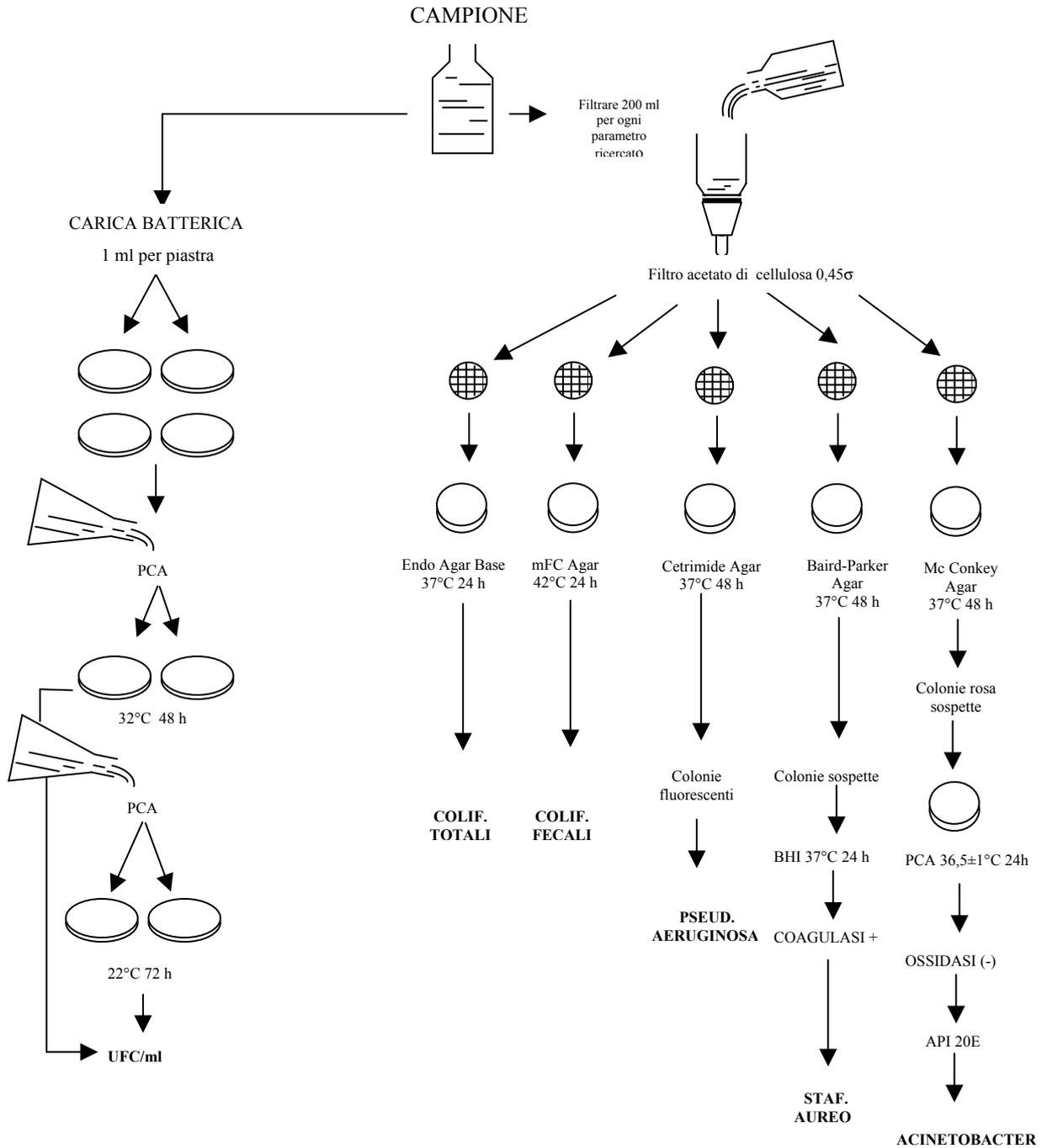
Analisi delle acque destinate alla balneazione – piscine
 Parametri microbiologici da determinare

- APPROVVIGIONAMENTO**
- Carica batterica mesofila 36 ± 1°C
 - Coliformi totali
 - *Escherichia coli*

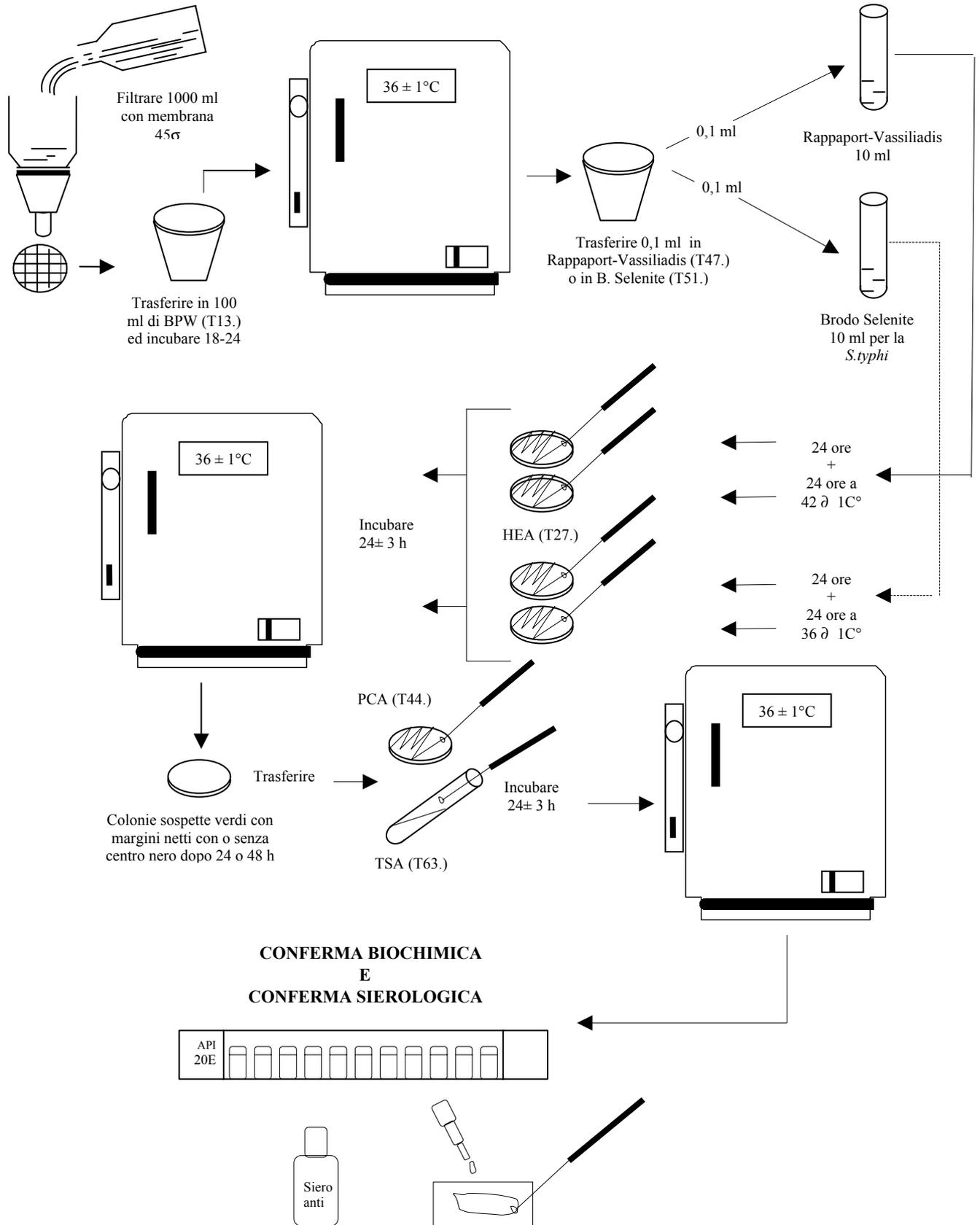
- ACQUA IMMISSIONE IN VASCA E ACQUA IN VASCA**
- Carica batterica mesofila 36°C ± 1°C – 22°C ± 1°C
 - Coliformi totali
 - *Stafilococco aureo*
 - *Streptococco fecale*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Escherichia coli*



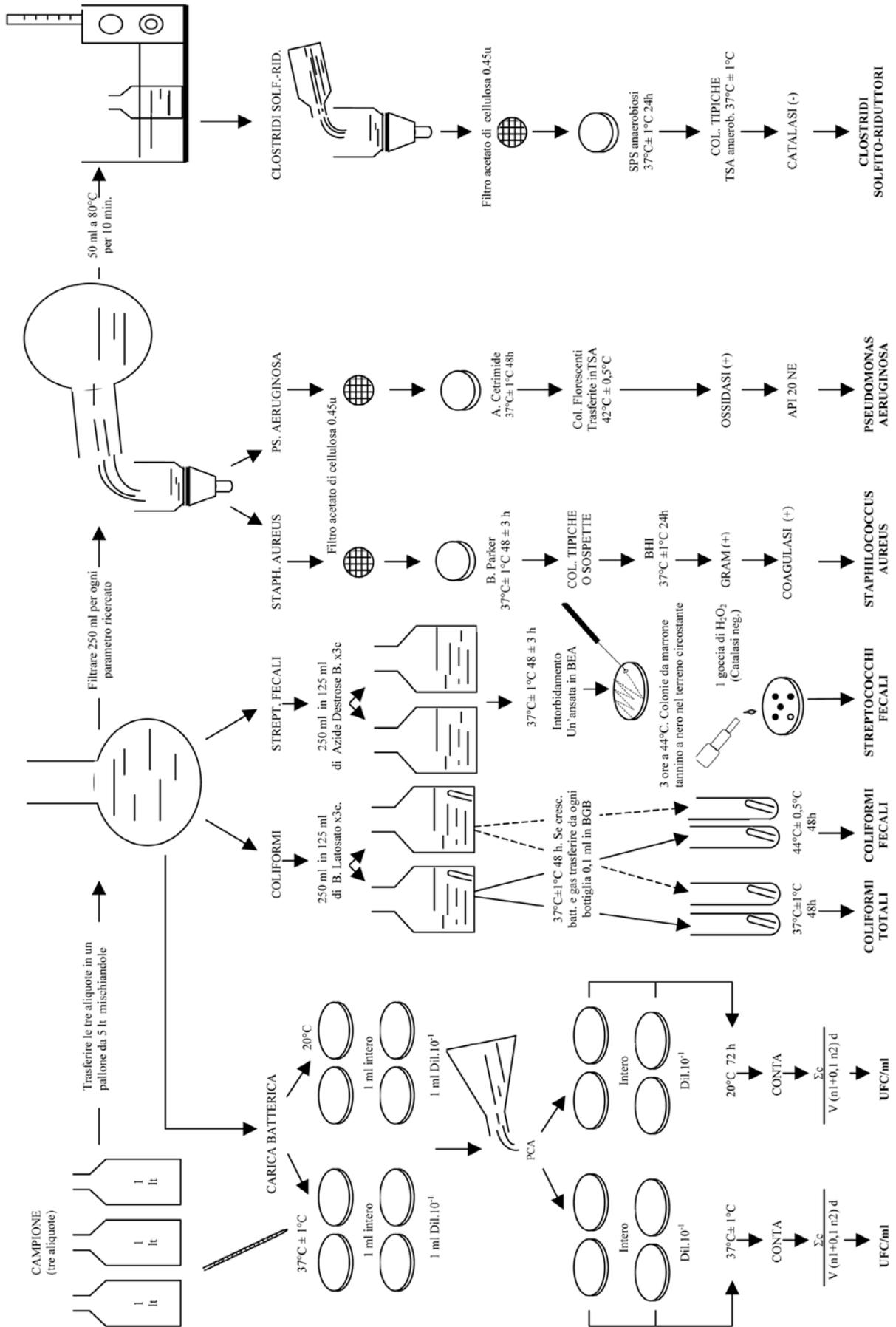
Analisi delle acque per dialisi
Parametri microbiologici da determinare



**Ricerca *Salmonella* spp. su acque superficiali di fiume, di lago,
e su acque reflue sottoposte a trattamento**



Acque minerali – analisi batteriologica



ESPRESSIONE DEI RISULTATI - RIPETIBILITÀ

Stima della ripetibilità in due prove in parallelo
Doppia piastra per ciascuna diluizione

Stima della dispersione dei valori nelle diluizioni esaminate $\longrightarrow K_p \mid \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{|C_1 + C_2|}}$ C_1 e C_2 = conta delle due piastre della stessa diluizione

Criteri di accettabilità della ripetibilità in due prove in parallelo

Segue la distribuzione di α

$K_p \mid 1,96 - 2,0$	\longrightarrow	$P - 95\%$	\longrightarrow	La dispersione dei conteggi è accettabile
$2,0 \mid K_p \mid 2,576 - 2,6$	\longrightarrow	$P - 99\%$	\longrightarrow	La dispersione dei conteggi è considerata critica, è necessario approfondire prima di esprimere il risultato verificare il conteggio della diluizione successiva
$K_p \mid 2,6$	\longrightarrow	$p \mid 99\%$	\longrightarrow	La dispersione dei conteggi è inaccettabile

ESEMPIO: Prima diluiz. 10^{-3} 181 e 215 ufc K_p 1,708564
 Seconda diluiz. 10^{-4} 20 e 25 ufc K_p 0,745356
 La dispersione dei risultati in entrambe le prove in parallelo è accettabile

Valutazione della proporzionalità delle conte in due diluizioni successive nelle prove condotte in parallelo

La valutazione della proporzionalità delle conte in due diluizioni successive per il conteggio è fatta con la formula $\longrightarrow G_1^2 \mid \left(\frac{OC_1}{R_1} - \frac{OC_2}{R_2} \right)^2 \cdot \frac{OC_1 + OC_2}{OC_1 \cdot OC_2}$

C_1 e C_2 sono i rispettivi conteggi. R_1 e R_2 sono i rapporti di diluizione 10 ed 1

ESEMPIO: applicando la formula ai dati del

$$G_1^2 \mid \left(\frac{181}{10} - \frac{215}{1} \right)^2 \cdot \frac{181 + 215}{181 \cdot 215} = 0,638336$$

G_1^2 Segue la distribuzione di θ^2

Criteri di valutazione della proporzionalità delle diluizioni

$G_1^2 \leq \Omega \theta_1^2$ Per 1 g.l. (due successive diluizioni prese in esame) $P = 95\%$ $\theta_1^2 = 3,841$

Calcolo dei limiti fiduciali al 95%

$B = V(n_1 + n_2)$ $t \mid \left(\frac{OC}{B} \pm \frac{1,92}{B} \cdot \frac{1,96 \Delta \sqrt{OC}}{B} \right) \cdot \frac{1}{d}$

ESEMPIO

$$t \mid \left(\frac{181}{10} \pm \frac{1,92}{10} \cdot \frac{1,96 \Delta \sqrt{181}}{10} \right) \cdot \frac{1}{10^3} \mid \left(\frac{215}{1} \pm \frac{1,92}{1} \cdot \frac{1,96 \Delta \sqrt{215}}{1} \right) \cdot \frac{1}{1}$$

Valore stimato

Se le colonie sono comprese tra 5 e 30 o >300 in terreni di accrescimento e tra 5 e 15 o >150 in terreni selettivi e/o differenziali procedere alla conta come indicato aggiungendo al risultato la dizione *valore stimato*

U.F.C./gr.o ml (valore stimato) = $1,0 \div 9,9 \times 10^n$

Per valori compresi tra 1 e 4 esprimere il risultato: U.F.C./gr o ml <5/d

Assenza di colonie tipiche o nessuna colonia: U.F.C./gr o ml < 1/d

Determinazione delle U.F.C. utilizzando terreni differenziali e/o selettivi

Allestire due piastre per ogni diluizione prevista, più una di controllo.

Diluizione 10^{-1} → 

Diluizione 10^{-2} → 

Controllo → 

Esaminare le piastre con 15 – 150 colonie. Prova valida se controllo colonie < 4 ufc

Contare in ogni piastra il numero di colonie sospette. Confermarle utilizzando le apposite prove descritte nel metodo di prova specifico per il gruppo e/o specie. Esaminare almeno 5 ufc per piastra o tutte se presenti in numero inferiore



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

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

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

Il numero delle UFC/g – ml è calcolato applicando la formula



$$\text{U.F.C. / g – ml} = \frac{\Sigma a}{V (n_1 + 0,1 * n_2) d}$$

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

ESEMPIO

Fattore di diluizione	UFC sospette	UFC testate	UFC confermate	UFC calcolate
-3	66	8	6	50
-3	80	9	6	53
-4	7	5	4	6
-4	4	4	4	4

$$\text{U.F.C. / g – ml} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1 (2 + 0,1 * 2) 10^3} = 51.363 = 5,1 \times 10^4$$

TERRENI DI COLTURA - REAGENTI E SOLUZIONI

PREMESSA

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, per altri occorre, al momento della preparazione, l'aggiunta di costituenti quali antibiotici, atfungini 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 differenziati	Tutti quelli che contengono particolari substrati e indicatori che evidenziano le caratteristiche biochimiche del batterio studiato, come, ad esempio, l'utilizzo o no di alcuni carboidrati, la produzione di decarbossilasi, deaminasi, la decomposizione di proteine ecc.

La loro preparazione 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 il suo arrivo, la ditta fornitrice, la 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 deionizzata, sciolto in bagnomaria bollente fino a completa soluzione ed infine sterilizzato. Verrà inoltre misurato il pH che, qualora non rientrasse nei limiti indicati, dovrà essere aggiustato con soluzioni di NaHO di HCL 0,1 N.

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

- controllo della sterilità;
- controllo della fertilità;
- controllo della selettività.

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

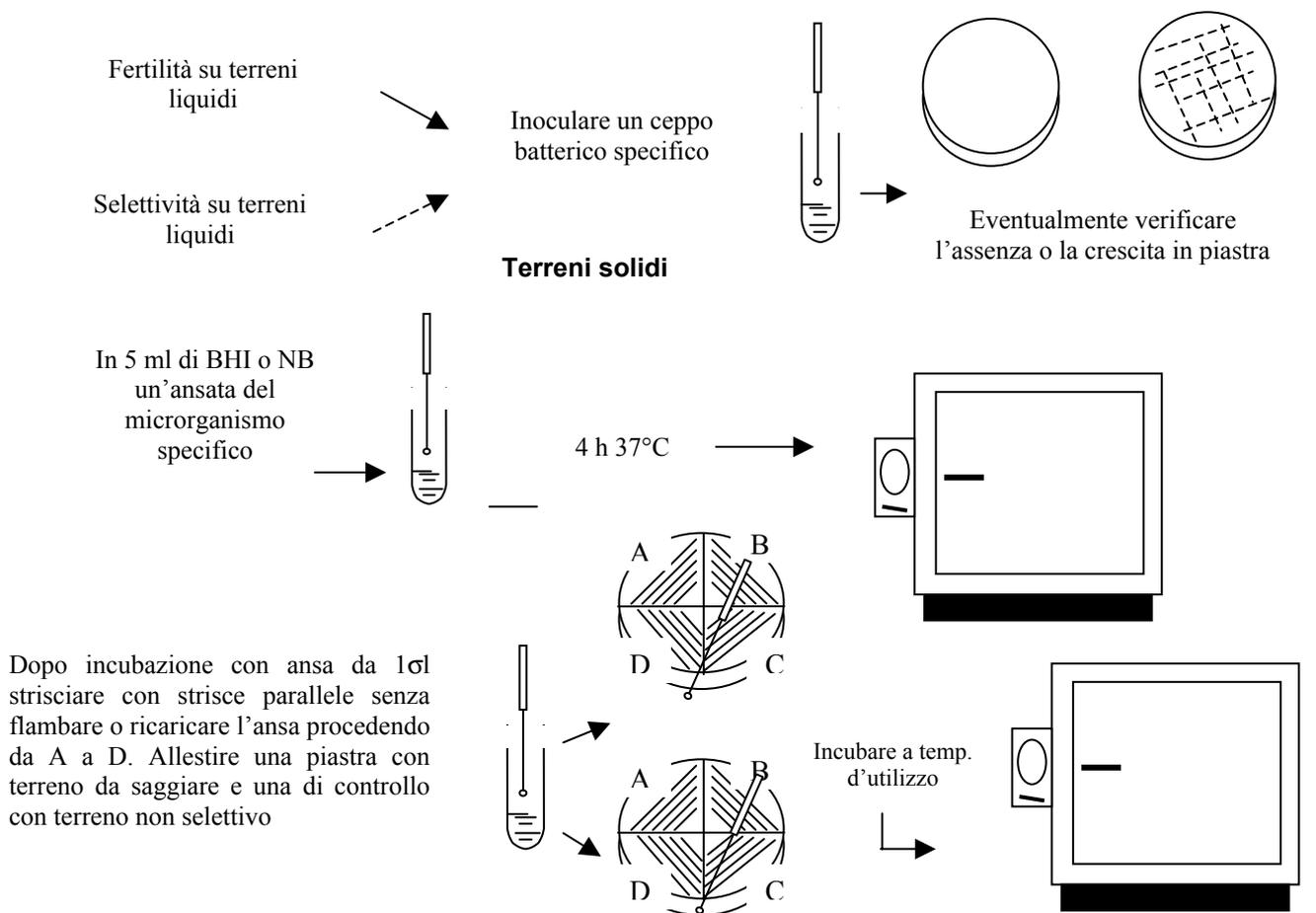
VALUTAZIONE DELLA PRODUTTIVITÀ E DELLA SELETTIVITÀ DEI TERRENI COLTURALI PER PROVE MICROBIOLOGICHE

- 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.

Controlli su lotti e partite

- Test di sterilità → Mettere una piastra o provetta in incubazione per il tempo di utilizzo. Non deve avvenire crescita → Ogni seduta analitica
- Test di selettività → Microrganismi con crescita ottimale o inibiti dal terreno → Ogni nuovo Lotto. Su terreni pronti all'uso effettuare il controllo a campione almeno 2 volte all'anno.

Esecuzione del test



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 crescita e morfologia delle colonie e/o l'inibizione.

Criteri di accettabilità

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

TERRENI DI COLTURA

T 01. ACQUA PEPTONATA ALCALINA

Peptone.....	10	gr
Cloruro di sodio.....	10	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH 8.6.

Sterilizzare in autoclave 15 minuti a 121°C.

Conservare a 2 - 8°C.

T 02. ACQUA PEPTONATA SALINA ALCALINA (APA)

Peptone.....	20	gr
Cloruro di sodio.....	30	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH 8.6.

Sterilizzare in autoclave 15 minuti a 121°C.

Conservare a 2 - 8°C.

T 03. AEROMONAS MEDIUM BASE (RYAN)

Proteose peptone	5.0	gr
Estratto di lievito	3.0	gr
L-lisina monocloridrato	3.5	gr
L-arginina monocloridrato	2.0	gr
Inositolo.....	2.5	gr
Lattosio.....	1.5	gr
Sorbitolo.....	3.0	gr
Xilosio	3.75	gr
Sali biliari N.3	3.0	gr
Sodio tiosolfato	10.67	gr
Sodio cloruro	5.0	gr
Citrato ferrico ammoniacale.....	0.8	gr
Blu di bromotimolo	0.04	gr
Blu timolo.....	0.04	gr
Agar.....	12.5	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 8.0 \pm 0.1.

N. B. I terreni (T 999) sono elencati in ordine alfabetico. Segue elenco dei reagenti e delle soluzioni (R 999).

AMPICILLINA SELECTIVE SUPPLEMENT

Ogni flacone contiene:

Ampicillina.....2.5 mg
(equivalente a 5 mg/L di terreno finale)

Terreno completo

Aeromonas medium base29.5 g
Acqua distillata.....500 ml

Riscaldare a bagnomaria bollente e portare ad ebollizione agitando delicatamente. NON AUTOCLAVARE.
Raffreddare a 50°C. Aggiungere asetticamente 1 flacone di Ampicillina supplement, ricostituito con 2 ml di acqua distillata sterile. Mescolare con cura e distribuire in piastre sterili.
Conservare a 2-8°C.

T 04. AGAR GELISATO

AGAR N.1 (BATTERIOLOGICO)
GELATONE

Terreno completo

Agar n.115 gr
Gelatone5 gr
Acqua distillata.....1000 ml

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

T 05. AGAR NUTRITIVO SALINO

Estratto di carne.....3 gr
Peptone5 gr
Cloruro di sodio.....30 gr
Agar.....12-18 gr
Acqua distillata.....1000 ml

pH 8.5.

Autoclavare 15 minuti a 121°C.

T 06. AGAR SANGUE COLUMBIA

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

pH 7.3.

SANGUE DEFIBRINATO DI MONTONE

Terreno completo

Terreno base	950	ml
Sangue defibrinato di montone	50	ml

Conservare a 4-8°C.

T 07. AZIDE DEXTROSE BROTH (ROTHER)

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

pH finale 6.8 \pm 0.2.

Sospendere 35.6 gr 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 08. BACILLUS CEREUS SELECTIVE AGAR BASE

Peptone	1.0	gr
Mannitolo	10.0	gr
Sodio cloruro	2.0	gr
Magnesio solfato	0.1	gr
Sodio solfato monoacido	2.5	gr
Potassio fosfato biacido.....	0.25	gr
Sodio piruvato	10.0	gr
Blu di bromotimolo	0.12	gr
Agar.....	14.0	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.2 \pm 0.2.

BACILLUS CEREUS SELECTIVE SUPPLEMENT

Ogni flacone contiene:

Polimixina B.....	50.000 U.I.
-------------------	-------------

(equivalente a 100.000 U.I./L di terreno finale)

EGG YOLK EMULSION

Terreno completo

Bacillus cereus selective agar base.....	20.5	gr
Acqua distillata.....	475	ml

Riscaldare a bagnomaria fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti, raffreddare a 50°C. Aggiungere asepticamente un flacone di Bacillus cereus selective supplement - ricostituito con 2 ml di acqua distillata sterile - e 25 ml di EGG yolk emulsion. Mescolare e distribuire in piastre sterili. Conservare il terreno a 2-8°C.

T 09. 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	gr
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 asepticamente 50 ml di Egg Yolk Tellurite Emulsion. Mescolare con cura e versare in piastre sterili. Conservare il terreno a 2-8°C.

T 10. BILE ESCULIN AZIDE AGAR

Yeast extract.....	5	gr
Proteose peptone N.3.....	3	gr
Tryptone	17	gr
Oxgall	10	gr
Esculin.....	1	gr
Ferric ammonium citrate	0.5	gr
Sodium chloride	5	gr
Sodium azide	0.15	gr
Agar.....	15	gr
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 11. BRAIN HEART INFUSION (BROTH)

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

pH finale 7.4 \pm 0.2.

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

T 12. BRILLIANT GREEN BILE 2%

Peptone.....	10	gr
Oxgall.....	20	gr
Lactose.....	10	gr
Brilliant Green.....	0.0133	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.2 \pm 0.2.

Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 13. BUFFERED PEPTONE WATER

Peptone.....	10.0	gr
Sodio cloruro.....	5.0	gr
Sodio fosfato monoacido.....	3.5	gr
Potassio fosfato biacido.....	1.5	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.2 \pm 0.2.

Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 14. CAMPYLOBACTER BLOOD FREE SELECTIVE AGAR BASE (CAT)

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

pH 7.4 \pm 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 15. CAMPYLOBACTER SELECTIVE ENRICHMENT BROTH

NUTRIENT BROTH N. 2

LAKED HORSE BLOOD 5%

CAMPYLOBACTER GROWTH SUPPLEMENT

Sodio piruvato 0.125 gr
(equivalente a 0.25 g/L di terreno finale)
Sodio metasolfito..... 0.125 gr
(equivalente a 0.25 g/L di terreno finale)
Solfato ferroso 0.125 gr
(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 gr di Nutrient Broth N.2 in 475 ml di acqua distillata sterile. Riscaldare in bagnomaria 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 16. C-EC AGAR

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

pH finale 6.8 \pm 0.2.

Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 115 \pm 1°C per 15 \pm 1 minuti. Distribuire in piastre sterili.

T 17. CETRIMIDE AGAR BASE

Peptone	20.0	gr
Magnesium chloride	1.4	gr
Potassium sulfate	10	gr
Cetrimide	0.3	gr
(Cetyltrimethylammonium bromide)		
Agar	13.6	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH finale 7.2 \pm 0.2.

Sospendere 45,3 gr in 1000 ml di acqua distillata sterile ed aggiungere 10 ml di glicerolo. Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C e distribuire in piastre sterili.

T 18. m CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (m-CP) MEDIUM**m CP AGAR BASE**

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

pH finale 7.6 \pm 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 gr di m-CP Agar Base in 500 ml di acqua distillata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere asepticamente m-CP Selective Supplement ricostituito con 2 ml di acqua distillata sterile.

Aggiungere inoltre:

Fenoltaleina difosfato 0,5% 10 ml
Indosil η-D-glucoside 0,75% 4 ml
(equivale a 30 mg in 4 ml)

T 19. COOKED MEAT MEDIUM

Beef heart 454 gr
Proteose peptone 20 gr
Dextrose 2 gr
Sodium chloride 5 gr
Acqua distillata 1000 ml

pH finale 7.2 ± 0.2.

Reidratare il terreno distribuendo 1.25 gr 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 alcuni minuti, raffreddato a 37°C e inoculato.

T 20. CHROMOGENIC E.COLI/COLIFORM MEDIUM

Miscela cromogenica 20,3 gr
Estratto di lievito 3 gr
Peptone 5 gr
Lattosio 2,5 gr
Sodio cloruro 5 gr
Sodio fosfato monoacido 3,5 gr
Potassio fosfato biacido 1,5 gr
Rosso neutro 0,03 gr
Agar 15 gr
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 21. DEFINED SUBSTRATE TECHNOLOGY (COLILERT)

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

Hepes buffer:

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

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

T 22. m ENDO AGAR LES

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

pH finale 7.2 \pm 0.2.

ALCOL 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	gr
Alcol etilico.....	20	ml
Acqua distillata.....	1000	ml

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

T 23. EOSIN METHYLENE BLEU (E.M.B.) AGAR (LEVINE)

Peptone.....	10.0	gr
Lattosio.....	10.0	gr
Potassio fosfato monoacido.....	2.0	gr
Eosina Y.....	0.4	gr
Blu di metilene.....	0.065	gr
Agar.....	15.0	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 6.8 \pm 0.2.

Riscaldare a bagnomaria fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti, raffreddare a 60°C e agitare il terreno per ossigenare il blu di metilene. Distribuire in piastre sterili. Conservare a 2-8°C al riparo della luce.

T 24. ETHYL VIOLET AZIDE (EVA) BROTH

Peptone.....	20.0	gr
Sodio cloruro.....	5.0	gr
Destrosio.....	5.0	gr
Potassio fosfato monoacido.....	2.7	gr
Potassio fosfato biacido.....	2.7	gr
Sodio azide.....	0.4	gr
Violetto di etile.....	0.83	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.0 \pm 0.2.

Sciogliere in bagnomaria fino a completa soluzione. Distribuire in provette o flaconi e autoclavare a 121°C per 15 minuti. Conservare a 2-8°C.

T 25. m FC AGAR

Tryptose.....	10.0	gr
Proteose peptone N.3.....	5.0	gr
Yeast extract.....	3	gr
Lactose.....	12.5	gr
Bile salts N.3.....	1.5	gr
Sodium chloride.....	5	gr
Aniline blue.....	0.1	gr
Agar.....	15	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.4 \pm 0.2.

ROSOLIC ACID (ACIDO ROSOLICO PER BATTERIOLOGIA)

IDROSSIDO DI SODIO (NaOH)

Sciogliere 1 gr 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	gr
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 26. FERMENTATION MEDIUM

Tripticase.....	10.0	gr
Neopeptone.....	10.0	gr
Sodio tioglicollato.....	0.25	gr
Agar.....	2.0	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

Sciogliere gli ingredienti, escluso l'agar, in acqua aggiustare il pH a 7.4, aggiungere l'agar e scaldare fino a completa soluzione. Distribuire 9 ml in tubi. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Prima dell'uso immergere per 10 minuti in acqua bollente e aggiungere a ciascun tubo una soluzione al 10% dello zucchero in prova.
Le soluzioni vanno sterilizzate per filtrazione.

T 27. HEKTOEN ENTERIC AGAR

Proteose peptone.....	12.0	gr
Estratto di lievito.....	3.0	gr
Lattosio.....	12.0	gr
Saccarosio.....	12.0	gr
Salicina.....	2.0	gr
Sali biliari n.3.....	9.0	gr
Sodio cloruro.....	5.0	gr
Sodio tiosolfato.....	5.0	gr
Ferrico ammonio citrato.....	1.5	gr
Fucsina acida.....	0.1	gr
Blu di bromotimolo.....	0.065	gr
Agar.....	14.0	gr
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 28. KF STREPTOCOCCUS AGAR

Proteose peptone n.3	10	gr
Yeast extract.....	10	gr
Sodium chloride	5	gr
Sodium glycerophosphate	10	gr
Maltose.....	20	gr
Lactose	1	gr
Sodium azide.....	0.4	gr
Brom cresol purple	0.015	gr
Agar.....	20	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.2 \pm 0.2.

TTC (cloruro di 2,3,5-trifeniltetrazolio).
Soluzione all'1%.

Terreno completo

KF Streptococcus agar	76.4	gr
-----------------------------	------	----

Portare ad ebollizione fino a soluzione completa. Autoclavare a 121°C per 10 minuti, raffreddare a 60°C ed aggiungere 1 ml di TTC-soluzione all'1% per ogni 100 ml . Distribuire in piastre.
Conservare a 2-8°C.

T 29. LACTOSE BROTH

Lab-lenco (estratto di carne)	3.0	gr
Peptone.....	5.0	gr
Lattosio.....	5.0	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 6.9 \pm 0.2.

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

T 30. LACTOSE GELATIN MEDIUM

Triptone	15.0	gr
Estratto di lievito	10.0	gr
Lattosio.....	10.0	gr
Gelatina	12.0	gr
Rosso fenolo.....	0.05	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

Sciogliere gli ingredienti, esclusa la gelatina, in 400 ml di acqua distillata. Sciogliere la gelatina in 600 ml di acqua distillata a 50-60°C. Mescolare le due parti aggiustare il pH a 7.5 e aggiungere il rosso fenolo. Mescolare e distribuire 10 ml in provette. Se non usato entro 8 ore dalla preparazione rigenerarlo in bagnomaria a 50-70°C per 2-3-ore oppure in bagnomaria bollente per 15 minuti.

T 31. LATTE AL TORNASOLE

SKIM MILK POWDER

Umidità.....	5.0	%
Ceneri.....	8.0	%
Azoto totale.....	5.3	%
Zuccheri riducenti (come il lattosio monoidrato).....	48.0	%
Estratto in etere solubile.....	0.25	%

Mescolare la polvere con una piccola quantità di acqua distillata sino ad ottenere una pasta omogenea, aggiungere altra acqua distillata finchè non si raggiunga una soluzione al 10% (p/v), equivalente al latte fresco scremato. Autoclavare a 121°C per 5 minuti. Evitare il surriscaldamento.

Terreno completo

Latte scremato in polvere (SK Milk).....	100	gr
Tornasole.....	0.75	gr
Acqua distillata.....	100	ml

pH 6.8 ± 0.2.

T 32. LEGIONELLA (GVPC) SELECTIVE MEDIUM

LEGIONELLA CYE AGAR BASE

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

LEGIONELLA GROWTH SUPPLEMENT

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

LEGIONELLA (CVPC) SELECTIVE SUPPLEMENT

Glicina (priva di ioni ammonio).....	1.5	gr
(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	gr
Legionella Growth supplement	1	flacone
Legionella (GVPC) selective supplement	1	flacone
Acqua distillata.....	450	ml

Sospendere 12.5 gr 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 e aggiungerlo ai 500 ml di Legionella BCYE-ζ Medium sterile.

Mescolare con cura e distribuire in piastre sterili.

T 33. LEGIONELLA b CYE-ζ GROWTH SUPPLEMENT

LEGIONELLA CYE AGAR BASE

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

LEGIONELLA GROWTH SUPPLEMENT (SR110A)

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

LEGIONELLA GROWTH SUPPLEMENT (SR110C)

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

Terreno completo (Supplemento SR110A)

Legionella CYE agar base.....	2.5	gr
Legionella Growth supplement (SR110A).....	1	flacone
Acqua distillata.....	90	ml

Sospendere 2.5 gr di Legionella CYE agar base in 90 ml di acqua distillata portare ad 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 (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	gr
Legionella Growth supplement (SR110C).....	1	flacone
Acqua distillata.....	450	ml

Sospendere 12.5 gr 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.

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 34. LISTERIA ENRICHMENT BROTH BASE (FDA)

Typtone Soya Broth	30.0	gr
Estratto di lievito	6.0	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.3 ± 0.2.

LISTERIA SELECTIVE ENRICHMENT SUPPLEMENT (FDA)

Acido nalidixico	20.0	mg
(equivalente a 40.0 mg/L di terreno finale)		
Cicloeximide	25.0	mg
(equivalente a 50.0 mg/L di terreno finale)		
Acriflavina cloridrato	7.5	mg
(equivalente a 15.0 mg/L di terreno finale)		

Terreno completo

Listeria Enrichment Broth Base	18	gr
Acqua distillata.....	500	ml

Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C. Aggiungere asepticamente 1 flacone di Listeria Selective Enrichment Supplement ricostituito con 2 ml di acqua distillata sterile. Distribuire in flaconi in quantità desiderata.

T 35. LISTERIA FRASER BROTH BASE

Proteose peptone	5.0	gr
Tryptone	5.0	gr
Lab-Lemco (estratto di carne).....	5.0	gr
Estratto di lievito	5.0	gr

Sodio cloruro	20.0	gr
Sodio fosfato monoacido.....	12.0	gr
Potassio fosfato biacido.....	1.35	gr
Esculina	1.0	gr
Litio cloruro.....	3.0	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.2 \pm 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	gr
Acqua distillata.....	500	ml

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

T 36. LISTERIA PALCAM AGAR BASE

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

pH finale 7.2 \pm 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	gr
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 37. LIVER VEAL AGAR

Liver Infusion from.....	50	gr
Veal Infusion from.....	500	gr
Proteose peptone.....	20	gr
Gelatin.....	20	gr
Soluble Starch.....	10	gr
Isoelectric casein.....	2	gr
Dextrose.....	5	gr
Neopeptone.....	1.3	gr
Tryptone.....	1.3	gr
Sodium chloride.....	5	gr
Sodium nitrate.....	2	gr
Agar.....	15	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.3 \pm 0.2.

Portare ad ebollizione in bagnomaria fino a completa soluzione. Distribuire in provette o matracci e autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed eseguire la semina in tubo o in piastra. Se in piastra aggiungere dopo l'inoculo altri 5 ml dello stesso terreno. Se non usato dopo la preparazione il terreno dovrà essere rigenerato per 10 minuti in bagnomaria bollente.

T 38. Mac CONKEY AGAR

Peptone.....	20	gr
lattosio.....	10	gr
Sali biliari.....	5	gr
Sodio cloruro.....	5	gr
Rosso neutro.....	0.075	gr
Agar.....	12	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.4 \pm 0.2.

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Distribuire in piastre sterili e conservare a 2-8°C.

T 39. MANNITOLO SALT AGAR

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

pH finale 7.5 \pm 0.2.

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

T 40. MOTILITY NITRATE MEDIUM

Peptone	5	gr
Estratto di carne.....	3.0	gr
Potassio nitrato	1	gr
Fosfato bisodico	2.5	gr
Galattosio	5	gr
Glicerolo.....	5	gr
Agar	3	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

Sciogliere, escluso l'agar, in acqua distillata. Aggiustare il pH a 7.4, aggiungere l'agar e scaldare a 100°C fino a completa soluzione. Distribuire 11 ml in tubi. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.
Se non usato subito riscaldare in acqua bollente per 10 minuti prima dell'uso.

T 41. MULLER-KAUFFEMANN TETRATHIONATE BROTH BASE

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

SOLUZIONE IODICA

Iodio	20	gr
Potassio ioduro	25	gr
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	gr
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 gr 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 42. NUTRIENT BROTH

Lab-Lenco (Estratto di carne)	1.0	gr
Estratto di lievito	2.0	gr
Peptone.....	5.0	gr
Sodio cloruro	5.0	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.4 ± 0.2 .

Sospendere 13 gr di polvere in 1000 ml di acqua distillata. Mescolare bene e distribuire. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Dopo preparazione conservare a temperatura inferiore a 25°C.

T 43. NUTRIENT BROTH N.2

Lab-Lenco (Estratto di carne)	10	gr
Peptone.....	10	gr
Sodio cloruro	5	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.5 ± 0.2

Sospendere 25 gr di polvere in 1000 ml di acqua distillata. Mescolare bene e distribuire. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Conservare a temperatura inferiore a 25°C.

T 44. PLATE COUNT AGAR STANDARD (APHA)

Estratto di lievito	2.5	gr
Digerito pancreatico di caseina	5.0	gr
Destrosio.....	1.0	gr
Agar.....	15.0	gr
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 45. PLATE COUNT BROTH

Yeast extract.....	5	gr
Tryptone.....	10	gr
Dextrose.....	2	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.0 \pm 0.2.

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

T 46. PSEUDOMONAS AGAR BASE/CN-AGAR

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

pH finale 7.1 \pm 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 47. RAPPAPORT-VASSILIADIS SOYA PEPTONE (RVS) BROTH

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

PH finale 5.2 \pm 0.2.

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 48. RINGER SOLUTION (1/4X)

Sodio cloruro	2.25	gr
Potassio cloruro	0.105	gr
Calcio cloruro-6H ₂ O.....	0.12	gr
Sodio bicarbonato.....	0.05	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH finale 7.0 \pm 0.2.

Una compressa serve per preparare 500 ml di soluzione di Ringer 1/4 concentrata. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 49. ROSE-BENGALA CHLORAMPHENICOL AGAR

Peptone micologico	5.0	gr
Destrosio.....	10.0	gr
Potassio fosfato monoacido.....	1.0	gr
Magnesio solfato	0.5	gr
Rosa bengala	0.05	gr
Agar.....	15.5	gr
Acqua distillata.....	1000	ml

pH 7.2 \pm 0.2.

CHLORAMPHENICOL SELECTIVE SUPPLEMENT

Cloramfenicolo.....	50	mg
(equivalente a 100/L di terreno finale)		

Terreno completo

Rose-bengala chloramphenicol agar	16	gr
Chloramphenicol selective supplement.....	1	flacone
Acqua distillata.....	500	ml

Sospendere 16 gr di Rose-bengala chloramphenicol agar in 500 ml di acqua distillata. Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Aggiungere un flacone di Chloramphenicol selective supplement ricostituito con 3 ml di acetone. Mescolare e autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C e distribuire in piastre sterili.

T 50. SALT POLYMYXIN BROTH

Peptone.....	10	gr
Estratto di lievito	3	gr

Cloruro di sodio.....20 gr
Acqua distillata..... 1000 ml

pH 7.4.

SOLUZIONE DI POLIMIXINA B

Polimixina B..... 100.000 U.I.
Acqua distillata..... 100 ml

Sciogliere la Polimixina nell'acqua e strilizzare per filtrazione.

Salt Polymixin broth..... 900 ml
Soluzione di Polimixina 100 ml

Aggiungere asetticamente la soluzione di polimixina appena preparata al terreno disciolto e portato a temperatura di 45-50 °C e distribuire in bottiglie sterili. Utilizzare lo stesso giorno.

T 51. SELENITE BROTH BASE

Peptone batteriologico..... 5.0 gr
Lattosio..... 4.0 gr
Sodio fosfato 10.0 gr
pH finale 7.1 \pm 0.2

Dopo aver sciolto 4 gr di Sodium Biselenite in 1000 ml di acqua distillata aggiungere 19 gr di Selenite Broth Base. Sterilizzare per 10 minuti in bagnomaria bollente. NON AUTOCLAVARE.

T 52. SLANETZ AND BARTLEY MEDIUM

Triptosio 20.0 gr
Estratto di lievito 5.0 gr
Destrosio..... 2.0 gr
Sodio fosfato monoacido 2H₂O..... 4.0 gr
Sodio azide 0.4 gr
Tetrazolio cloruro 0.1 gr
Agar 10.0 gr
Acqua distillata..... 1000 ml

pH finale 7.0 \pm 0.2.

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

T 53. SPS AGAR

Triptone	15.0	gr
Estratto di lievito	10.0	gr
Sodio solfito	0.50	gr
Ferrico citrato	0.50	gr
Polimixina B solfato	0.01	gr
Sulfadiazina	0.12	gr
Agar	13.50	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH finale 7.0 \pm 0.2.

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

T 54. TCBS CHOLERA MEDIUM

Yeast extract	5	gr
Proteose peptone n.3	10	gr
Sodium citrate	10	gr
Sodium thiosulfate	10	gr
Oxgall	8	gr
Saccharose	20	gr
Sodium chloride	10	gr
Ferric citrate	1	gr
Brom tymol bleu	0.04	gr
Thimol bleu	0.04	gr
Agar	15	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH finale 8.6 \pm 0.2.

Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Raffreddare a 50 °C e distribuire in piastre. NON AUTOCLAVARE.

T 55. TERGITOL – 7 AGAR (ISO)

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

pH finale 7.2 \pm 0.2

SOLUZIONE DI TTC

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

Sospendere 54,15 gr di Tergitol-7 Agar in acqua distillata. Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 50 °C e aggiungere 1 fiala di TTC Solution. Distribuire in piastre sterili.

T 56. THIOGLYCOLLATE MEDIUM (BREWER)

Lab-Lemco (estratto di carne)	1.0	gr
Estratto di lievito	2.0	gr
Peptone	5.0	gr
Destrosio	5.0	gr
Sodio cloruro	5.0	gr
Sodio tioglicolato	1.1	gr
Blu di metilene	0.002	gr
Agar	1.0	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH finale 7.2 \pm 0.2.

Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione, mescolare e distribuire in contenitori e autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare lentamente lontano da correnti d'aria. Conservare a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Se il terreno è usato nei giorni successivi alla preparazione, e più di un terzo è di color verde, scartare le provette. Se la parte ossidata è invece inferiore ad un terzo mettere le provette con i tappi allentati in bagnomaria bollente per 5-10 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente ed inoculare.

T 57. TRIFENILTETRAZOLIO CLORURO SOIA TRIPTONE AGAR (TSAT)

Triptone	15	gr
Peptone di soia	5	gr
Cloruro di sodio	30	gr
Saccarosio	20	gr
Sali biliari n.3	0.5	gr
Agar	12-18	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH 7.1.

SOLUZIONE DI TRIFENILTETRAZOLIO CLORURO (1%)

Trifeniltetrazolio cloruro	0.1	gr
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 asepticamente la soluzione di trifeniltetrazolio cloruro (1%), appena preparata, al terreno disciolto e portato a 45-50°C. Distribuire in bottiglie sterili.

T 58. TRIPTOFANO BROTH

Digerito triptico di caseina 10 gr
L-triptofano 1 gr
Cloruro di sodio 5 gr
Acqua distillata 1000 ml

pH finale 7.5 \pm 0.1.

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

T 59. TRIPTONE ACQUA TRIPTONATA STERILE 0.1%

Preparato ottenuto dalla digestione triptica della caseina.

Triptone 1 gr
Acqua distillata 1000 ml

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

T 60. TRYPTONE BILE AGAR (TBA)

Triptone 20 gr
Sali biliari 1,5 gr
Agar 15 gr
Acqua distillata 1000 ml

pH finale 7.2 \pm 0.2

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

T 61. TRYPTONE BILE X-GLUCORONIDE MEDIUN (TBX)

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

pH finale 7.2 \pm 0.2.

Sospendere in acqua distillata e autoclavare a 121°C per 15 minuti.
Raffreddare a 50°C e versare in piastre sterili. Conservare a 2-8°C.

T 62. TRYPTONE MUG SUPPLEMENT

Tryptone ottenuto dalla digestione triptica della caseina.

MUG SUPPLEMENT

4-metilumbelliferil-B-D-glucoronide (MUG)..... 50 mg
(polvere bianca liofilizzata)

Terreno completo

Tryptone 2 %
Cloruro di sodio..... 0.5 %
MUG..... 0.2 %
Acqua distillata 1000 ml

Autoclavare a 121 °C per 15 minuti.

T 63. TRIPTIC SOY AGAR

Tryptone (Pancreatic digest of casein 15 gr
Sytone (Papaic digest of soybean meal)..... 5 gr
Sodium chloride 5 gr
Agar..... 15 gr
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 64. TRYPTIC SOY AGAR YEAST EXTRAC

Typtone (Pancreatic digest of casein) 15 gr
Soytone (Papaic digest of soybean meal)..... 5 gr
Sodium chloride 5 gr
Agar..... 15 gr
Yeast extract..... 6 gr
Acqua distillata..... 1000 ml

pH finale 7.3 ∂ 0.2.

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

T 65. TRIPLE SUGAR IRON AGAR

Lab-Lemco (estratto di carne)	3.0	gr
Estratto di lievito	3.0	gr
Peptone	20.0	gr
Sodio cloruro	5.0	gr
Lattosio	10.0	gr
Saccarosio	10.0	gr
Destrosio	1.0	gr
Ferrico citrato	0.3	gr
Sodio tiosolfato	0.3	gr
Rosso fenolo		q.s.
Agar	12.0	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH finale 7.4 \pm 0.2.

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 66. UREA TRIPTOFANO

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

pH 6.9 \pm 0.2.

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

T 67. VIOLET RED BILE LACTOSE AGAR (VRBA)

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

pH finale 7.4 \pm 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 68. VIOLET RED BILE GLUCOSE AGAR (VRBGA)

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

pH finale 7.4 \pm 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 69. YEAST EXTRACT AGAR (YEA)

Estratto di lievito	3	gr
Peptone	5	gr
Agar	15	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH finale 7.4 \pm 0.2

Riscaldare in bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T 70. YERSINIA SELECTIVE AGAR BASE

Peptone special	20.0	gr
Estratto di lievito	2.0	gr
Mannitolo	20.0	gr
Sodio piruvato	2.0	gr
Sodio cloruro	1.0	gr
Magnesio solfato	0.01	gr
Sodio desossicolato	0.5	gr
Rosso neutro	0.03	gr
Cristal violetto	0.001	gr
Agar	12.5	gr
Acqua distillata	1000	ml

pH finale 7.4 \pm 0.2.

YERSINIA SELECTIVE SUPPLEMENT

Cefsulodina	7.5	mg
(equivalente a 15 mg/L di terreno finale)		
Irgasan	2.0	mg
(equivalente a 4 mg/L di terreno finale)		
Novobiocina	1.25	mg
(equivalente a 2.5 mg/L di terreno finale)		

Terreno completo

Yersinia selective agar base29 gr
Acqua distillata..... 500 ml

Riscaldare bagnomaria fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti e raffreddare a 50°C. Aggiungere asetticamente un flacone di Yersinia selective supplement precedentemente ricostituito con 2 ml di acqua distillata ed 1 ml di etanolo. Mescolare e versare in piastre sterili. Conservare a 2-8 °C per non più di 24 ore.

REAGENTI E SOLUZIONI

R 01. CATALASI (PROVA DELL'ATTIVITÀ CATALASICA)

Perossido di idrogeno (H₂O₂) al 3%.

Conservare in bottiglia scura a 4-8 °C.

R 02. CITOCROMO-OSSIDASI (PROVA DELLA...)

Dicloruro di tetrametil-p-fenilendiamina 1%

Dischi di carta in commercio

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. GRAM (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	gr
NaCH 1 N.....	10	ml
H ₂ O distillata	90	ml

SOLUZIONI ALCOLICHE MADRI

Fucsina basica	3	gr
Violetto di genziana	4.8	gr

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 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	gr
Alcol amilico	75	ml
Acido cloridrico concentrato (37%)	25	ml

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

R 07. SOLUZIONE FISIOLGICA STERILE

Cloruro di sodio.....	0.9	gr
Acqua distillata.....	100	ml

Autoclavare a 121 °C per 15 minuti.

TABELLE E DEFINIZIONI

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	-	-	-	-	-

Tabella 1 - MPN (Mac Crady). Inoculo del campione di: 3x1; 3x0.1; 3x0.01 gr o ml
De Man J.C. MPN Tables, corrected Eur. J. Appl. Biotechnol., 1983, 17,301-305 riportato in norme ISO 7251-1984

Significato delle categorie

Se dalla categoria 1 si passa 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.

Sigle Abbreviations	ITALIANO	INGLESE
AP Alc.	T01. Acqua peptonata alcalina	T01. Peptone saline water
APA	T02. Acqua peptonata salina alcalina	T02. Peptone saline alkaline water
AMB	T03. Terreno base per Aeromonas (Ryan)	T03. Aeromonas medium base (Ryan)
AG	T04. Agar gelisato	T04. Gelisate agar
ANS	T05. Agar nutritivo salino	T05. Nutrient saline agar
AS	T06. Agar sangue Columbia	T06. Columbia blood agar
ADB	T07. Brodo azide destrosio	T07. Azide dextrose broth (Rothe)
BCSA	T08. Bacillus cereus agar base selettivo	T08. Bacillus cereus selective agar base
BPAB	T09. Baird-Parker agar base	T09. Baird-Parker agar base
BEA	T10. Bile esculina azide agar	T10. Bile esculin azide agar
BHI	T11. Infuso cuore cervello (brodo)	T11. Brain heart infusion (broth)
BGB	T12. Verde brillante bile 2%	T12. Brilliant green bile 2%
BPW	T13. Acqua peptonata tamponata	T13. Bufferd peptone water
CAT	T14. Agar selettivo per campylobacter	T14. Campylobacter blood free selective agar base
CSEB	T15. Brodo di arricchimento selettivo per Camp.	T15. Campylobacter selective enrichment broth
C-EC	T16. C-EC agar	T16. C-EC agar
CAB	T17. Cetrimide agar base	T17. Cetrimide agar base
m-CP	T18. Clostridium perfringens medium	T18. Membrane Clostridium perfrin. Medium
CMM	T19. Terreno alla carne cotta	T19. Cooked meat medium
	T20. Terreno cromogeno per E.Coli/Coliformi	T20. Cromogenic E. Coli/Coliform Medium
DST	T21. Substrato MUG test (Colilert)	T21. Defined substrate technology (Colilert)
EAL	T22. mEndo agar les	T22. mEndo agar les
EMB	T23. Eosina blu di metilene agar (Levine)	T23. Eosin methylene bleu (E.M.B.) agar (Levine)
EVA	T24. Brodo etil violetto azide	T24. Ethyl violrt (EVA) brth
FC	T25. mFC agar	T25. mFC agar
FM	T26. Terreno fermentazione dei carboidrati	T26. Fermentation medium
HEA	T27. Agar Hektoen per enterobatteri	T27. Hektoen enteric agar
KF	T28. KF agar per streptococco	T28. KF streptococcus agar
LB	T29. Brodo lattosato	T29. Lactose broth
LGM	T30. Terreno alla gelatina	T30. Lactose gelatin medium
	T31. Latte al tornasole	T31. Litmus paper milk.
GVPC	T32. Legionella CYE agar base	T32. Legionella (GVPC) selective medium
BCYE-ζ	T33. Legionella BCYE-ζ	T33. Legionella BCYE-ζ Growth supplement
LEB	T34. Brodo di arricchimento per listeria	T34. Listeria enrichment broth base (FDA)
LFB	T35. Brodo di Fraser per listeria	T35. Listeria Fraser broth base
LPA	T36. Palcam agar per listeria	T36. Listeria Palcam agar base
LVA	T37. Infuso di fegato-vitello agar	T37. Liver veal agar
MCA	T38. Agar Mac Conkei	T38. Macconkei agar
MSA	T39. Agar mannitolo	T39. Mannitolo salt agar
MNM	T40. Terreno per la mobilità e nitrati	T40. Motility nitrate medium
MK	T41. Terreno al tetrato di Muller-	T41. Muller-Kauffmann tetrathionate broth base
NB	T42. Brodo nutritivo	T42. Nutrient broth
NB2	T43. Brodo nutritivo n.2	T43. Nutrient broth n.2
PCA	T44. Agar conta	T44. Plate count agar standard (APHA)
PCB	T45. Brodo per conta	T45. Plate count broth
PCN	T46. Pseudomonas Agar Base / CN-agar	T46. Pseudomonas Agar Base / CN-agar
RV	T47. Brodo di Rappaport-Vassiliadis	T47. Rappaport-Vassiliadis soya peptone (RVS)
RS	T48. Soluzione di Ringer (1/4)	T48. Ringer solution (1/4)
RBA	T49. Agar rosa – bengala cloramfenicolo	T49. Rose-bengala chloramphenicol agar
SPB	T50. Brodo sale polimixina	T50. Salt polymyxin broth
SB	T51. Brodo Selenite	T51. Selenite Broth Base
SBM	T52. Slanetz e Bartley medium	T52. Slanetz and Bartley Medium
SPS	T53. Polimixina solfato sulfadiazina Agar	T53. Sulphite Polimixin Sulphadiazina agar

TCBS	T54. Terreno selettivo per colera	T54. TCBS cholera medium
T-7A	T55. Tergitol-7 Agar	T55. Tergitol-7 Agar
TM	T56. Terreno al tioglicollato	T56. Thioglycollate medium (Brewer)
TSAT	T57. Agar trifeniltetrazolio cloruro soia triptone	T57. Trifhenyl tetrazolium chloride soya trypt.
TB	T58. Brodo al triptofano	T58. Triptofano Broth
AT	T59. Acqua triptonata 0.1%.	T59. Tryptone Water 0.1%
TBA	T60. Agar bile triptone	T60. Tryptone Bile Agar
TBX	T61. Terreno triptone bile x-glucoronide	T61. Tryptone bile x-glucoronide medium (TBX)
T-MUG	T62. Triptone -MUG	T62. Tryptone MUG supplement
TSA	T63. Agar al triptone e saitone	T63. Tryptic soy agar
TSAYE	T64. Agar al triptone e saitone estratto di lievito	T64. Tryptic soy agar yeast extrac
TSI	T65. Triplo zucchero agar	T65. Triple sugar iron agar
UT	T66. Urea triptofano	T66. Urea tryptophane
VRBA	T67. Agar bile al violetto di genziana	T67. Violet red bile agar (VRBA)
VRBGA	T68. Agar bile al violetto di genziana e glucosio	T68. Violet red bile glucose agar (VRBGA)
YEA	T69. Estratto di lievito agar	T69. Yeast extract agar (YEA)
YSA	T70. Agar selettivo per Yersinia	T70. Yersinia selective agar base
R01.	R01.Catalasi	R01. Catalase
R02.	R02.Citocromo - ossidasi	R02 Oxidase
R03.	R03.Coagulasi	R03. Coagulase test
R04	R04. Gram	R04. Gram
R05	R05. Holbrook e Anderson	R05. Holbrook e Anderson
R06.	R06.Kovac	R06. Kovac's reagent
R07.	R07.Soluzione fisiologica sterile	R07. Sterile physiologic solution
MPN	Numero più probabile	Most probable number
UFC	Unità formante colonia	

Tabella 2 - Definizioni

BIBLIOGRAFIA

- I rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare. Muffe, lieviti e micotossine*, in “Atti Conferenza Nazionale”, UNIPATH - Relazioni e posters. Bologna 5 maggio 1994
- 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., Belpassi L., Buonanno E., *Indagini sulla presenza di aeromonas spp nelle acque potabili della provincia di Pesaro*. L’Igiene Moderna (1992): 98, 703-712
- 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*. 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
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. e AAV.V., *Microbiologia alimentare aspetti microbiologici della sicurezza e qualità*. Tecniche nuove Editore 1990, Parte III pp.47-127
- Castellani Pastoris M., *Colera: diagnosi di laboratorio*. Istituto Superiore di Sanità 1976
- Ceol Aleardo, *Listeria monocytogenes - Cenni storici e stato dell’arte sulle tecniche laboratoristiche per la ricerca negli alimenti*. Regione Autonoma Valle d’Aosta. Agenzia regionale 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*. Seconda 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.3, *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 3.3.01
- 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 19.1.93
- Denis J., *Culture* Vol.7 n.1 “Argomenti di microbiologia”. OXOID Italiana 1989,1
- Denis J., Films, *Isolamento ambientale di legionella species*. Centre for Applied Microbiology Research, 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 monoytogenes 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

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'analyse pour le denombrement des colonies*. 169:1994

Gareri E., *Sintesi delle moderne conoscenze del colera*. Annali Sclavo 1973,15, n.4 pp. 453-494

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*. 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*

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*. Editore La Goliardica Pavese 2002

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 settembre 1991. Integrazioni e modifiche alla circolare n.61 del 9 agosto 1976, *Analisi microbiologiche di acque minerali naturali*

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 pp. 203-366. 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* Firenze, Rosini Editrice Srl 1981 Sez. II “batteriologia”

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

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