

**RICERCA DI INIBENTI (cfr. Decreto 10 marzo 1997 sul programma di controllo di
Salmonella Enteritidis e *S. Typhimurium*)**

Il metodo permette di rilevare la presenza di sostanze antibatteriche nei mangimi, carni, uova ed eventuali altre matrici.

I campioni vengono saggiati su terreni colturali agarizzati insemenzati con diversi microrganismi.

La presenza di sostanze antibatteriche e' rilevata dalle formazioni di un alone di inibizione della crescita dei microrganismi.

1. Ceppi di riferimento:

- a) *B. subtilis* BGA = Sensibili ai sulfamidici;
- b) *B. cereus* K250 = Resistente alle tetracicline;
- c) *B. cereus* ATCC 11778 = Sensibile alle tetracicline;
- d) *M. luteus* = Sensibilita' generale.

2. Terreno colturale:

nutrient agar g 25;
glucosio g 4;
NaCl g 10;
fosfato potassico monobasico g 1;
H₂O distillata cc 1000;
pH 7,2.

Distribuire 13 ml in provette e autoclavare a 121 (gradi centigradi) per 15',

oppure:

terreno (Biolife 2450);
biomeat g 6,25;
estratto di lievito g 3,75;
glucosio g 4,00;
NaCl g 10,00;
potassio fosfato bibasico g 1,00;
agar g 13,00;
H₂O distillata ml 1000,
pH finale 7,2.

Distribuire 13 ml in provette e autoclavare a 121 (gradi centigradi) per 15'.

3. Conservazione dei ceppi:

Insemenzare Tryptic Soy Agar a becco di clarino con una sospensione di microrganismi ed incubare a 30 per 24h. Conservare le colture in frigorifero a + 4 (gradi centigradi). Trapiantare ogni 20 giorni circa.

Terreno di coltura:

tryptic casein bios g15;
soia peptone g 5;
NaCl g 5;
agar g 15;
H₂O distillata ml 1.000,
pH 7,2,

Sterilizzare a 121 (gradi centigradi) per 15'.

4. Preparazione delle sospensioni di spore di *B. subtilis* e *B. cereus*:

Insemenzare con una sospensione ricca di cellule di *B. subtilis* e *B. cereus* (ottenuta raccogliendo la patina nei tubi a becco di clarino (3) con 4 cc di soluzione fisiologica) l'agar nutritivo (4.1) distribuito in bottiglie di Roux (300 ml) e incubare a 30 (gradi centigradi) per 10 giorni e raccogliere la patina con 15 ml di etanolo al 20% e omogeneizzare. (Circa 10(elevato a)7 germi / ml).

4.1 Terreno per la preparazione delle spore:

glucosio g 1;
peptone triptico g 10;
estratto di carne g 1,5;

estratto di lievito g 3;
agar g 30;
tween 80 ml 1;
tampone fosfato pH 5,5 ml 10;
acqua distillata fino a ml 1000;
pH dopo sterilizzazione 5,8.

5. Preparazione della sospensione *M. luteus*:

Seminare due provettoni contenenti agar nutritivo (5.1) con il ceppo e incubare a 37 (gradi centigradi) per 24h. Per l'allestimento delle piastre si deve impegnare una coltura preparata di recente.

5.1 Terreno per asporigeni:

infliso di cuore di bue g 5,0;
infliso di cervello g 12,5;
peptone g 10,0;
NaCl g 5,0;
glucosio g 2,0;
Na₂HPO₄ g 2,5;
acqua ml 1.000;
pH 7,4.

6. Sospensioni d'uso:

Le sospensioni alla concentrazione di 10 (elevato a) 7 germi / ml già pronte, da utilizzare per la semina dei terreni, si possono conservare alla temperatura di +5 (gradi centigradi) per almeno 5 mesi.

L'agar - germi (8) pronto per l'uso si può conservare a +5 (gradi centigradi) per 10 giorni ca.

7. Soluzione di trimethoprim:

Il trimethoprim è aggiunto al terreno per aumentare la sensibilità nei confronti dei sulfamidici.

Disciogliere 10 mg di trimethoprim in 10 ml di etanolo e agitare fino a completo discioglimento.

Diluire ulteriormente fino 1:200 con acqua distillata fino alla concentrazione di 5 (micron) g/ml. Per ogni 100 ml di terreno colturale aggiungere 1 ml di soluzione di trimethoprim (0,05 (micron) TMP/ml agar).

8. Preparazione delle piastre.

8.1 Depositare su piastre Petri 0,2 ml per ogni ceppo atterico in modo da avere una concentrazione di 10 (elevato a) 4 spore/ml. e colonie/ml.

8.2 Sciogliere il terreno di coltura preparato in precedenza in provette (2), raffreddarlo a 50 (gradi), depositarlo nelle piastre e mescolarlo con i ceppi.

8.3 Far raffreddare le piastre.

A) Inibenti nelle carni:

a) depositare in ogni piastra preparata (7) un pezzetto di muscolo, rene o fegato del diametro di 8 mm circa;

b) incubare le piastre con i ceppi *B. subtilis* e *B. cereus* alla temperatura di 30 (gradi centigradi), e quelle con *M. luteus* a 37 (gradi centigradi) C per 24 ore.

Interpretazione dei risultati: sono ritenuti positivi per inibenti i campioni che presentano un alone di inibizione > 2 mm.

B) Inibenti nelle uova:

separare tuorlo e albume;

diluire ciascuno 1:3 in tampone fosfato - metanoio (2:1) (9);

omogenare e congelare i campioni;

scongolarli e centrifugarli a 4.000 g per 15';

riscaldare i campioni a 65 (gradi centigradi) per 15' per inattivare il lisozima;

fare in ciascuna piastra preparata (8) due pozzetti per campione, seminando in uno 0,2 ml di albume e nell'altro 0,2 ml di tuorlo;

incubare le piastre con i ceppi *B. subtilis* e *B. cereus* alla

temperatura di 30 (elevato a)0 C, e quelle con *M. luteus* a 37 (elevato a)0 C per 24 ore.

Interpretazione dei risultati: sono ritenuti positivi per inibenti i campioni che presentano un alone di inibizione > 2 mm.

C) Inibenti nei mangimi.

9. Estrazione.

Tre aliquote da 10 g del mangime vengono aggiunte rispettivamente a 50 ml di ciascun solvente di estrazione (10).

Le mescolanze vengono mantenute a temperatura ambiente per almeno 2h.

Preparare le piastre secondo il punto 8.

Praticare nello spessore dell'agar 3 pozzetti per piastra del diametro di 13 mm.

Depositare in ogni pozzetto 0,1 ml di ciascun estratto.

Incubare le piastre con i ceppi *B. subtilis* e *B. cereus* alla temperatura di 30 (gradi centigradi), e quelle con *M. luteus* a 37 (gradi centigradi) per 24 ore.

Interpretazione dei risultati: sono ritenuti positivi per inibenti i campioni che presentano un alone di inibizione > 2 mm.

10. Preparazione dei solventi:

tampone fosfato - bicarbonato (pH 8):

fosfato bipotassico g 16,73;

fosfato monopotassico g 0,523;

carbonato monosodico g 20;

acqua distillata fino a cc 1.000.

Solvente 1 = metanolo + tampone bicarbonato pH 8 (1:1) (v:v).

Solvente 2 = acqua distillata + tampone bicarbonato pH 8 (3:7) (v:v).

Solvente 3 = metanolo.