

AGGIORNAMENTI SUI METODI DI ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI MICRORGANISMI PATOGENI PRESENTI NEGLI ALIMENTI

Presentazione a cura
Dott.ssa Irene Tellini

Tutor: Prof. B. Cenci Goga

REGOLAMENTO (CE) n. 2073 DEL 2005

Stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti di origine alimentare, attraverso dei criteri, distinti in due grandi capitoli:

- ▶ Cap.1 CRITERI DI SICUREZZA ALIMENTARE, definiscono l'accettabilità dei prodotti alimentari immessi sul mercato
- ▶ Cap.2 CRITERI DI IGIENE DEL PROCESSO, definiscono il funzionamento accettabile del processo di produzione

REGOLAMENTO (CE) 2073 DEL 2005

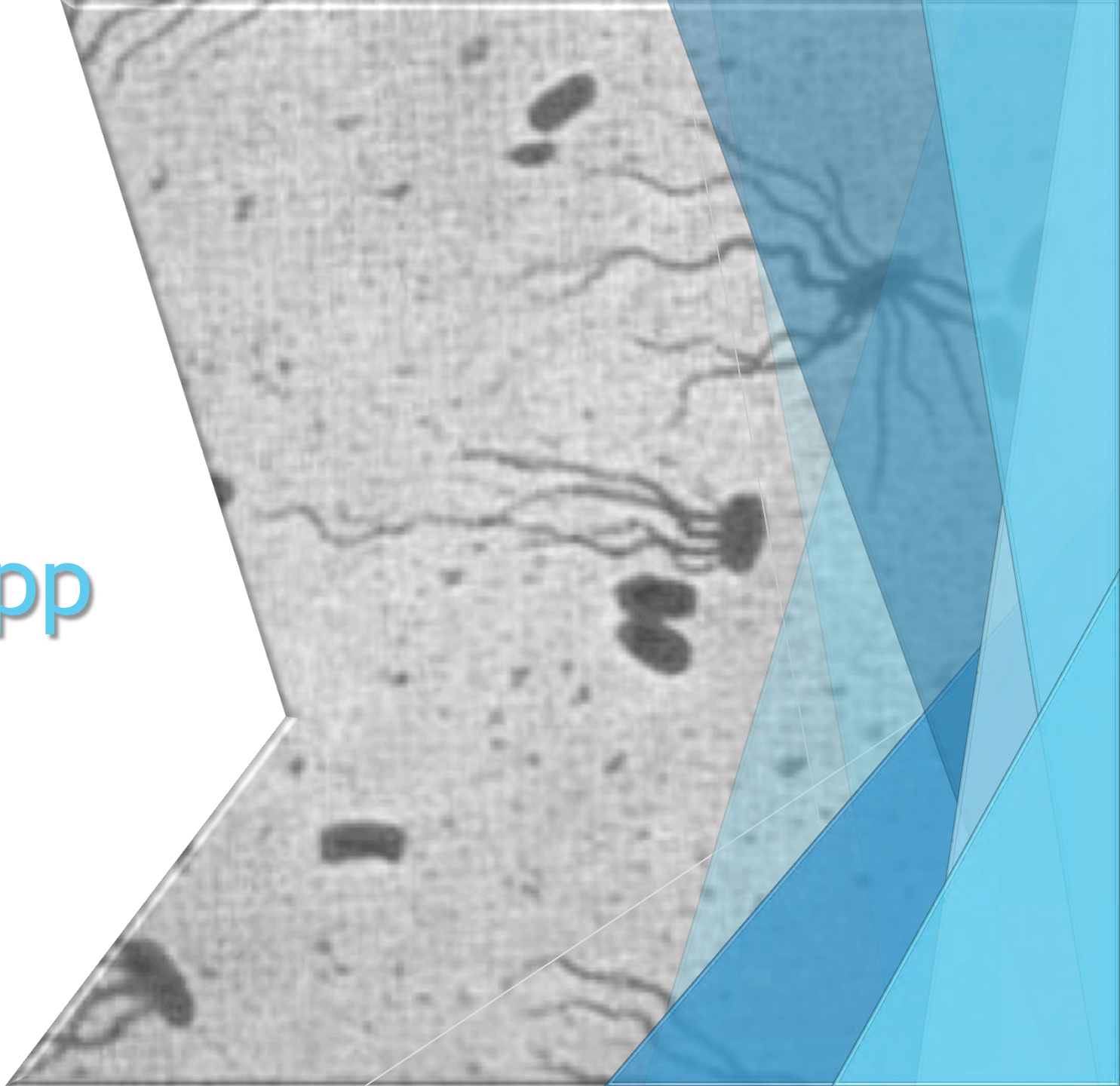
Capitolo I. Criteri di sicurezza alimentare

Categorie alimentare	Microorganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (*)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (*)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (4)		EN/ISO 11290-2 (5)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 g (6)		EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3 Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (*) (7)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (5)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

MICRORGANISMI PATOGENI e LORO PRODOTTI RICERCATI NEGLI ALIMENTI

- Listeria Monocytogenes ←
- Cronobacter Spp
- Salmonella ←
- E.coli
- Istamina
- Stafilococchi coagulasi-positivi ←
- Bacillus cereus
- Microrganismi aerobi

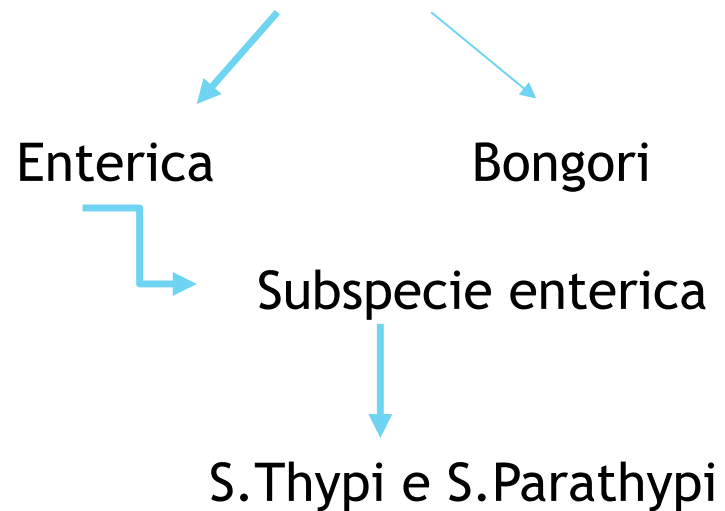
SALMONELLA Spp



SALMONELLA Spp



- Appartengono alla famiglia delle Enterobacteriacee
- All'interno del genere Salmonella esistono un gran numero di sierotipi (>2400)
- E' divisa in due specie



SALMONELLA Spp

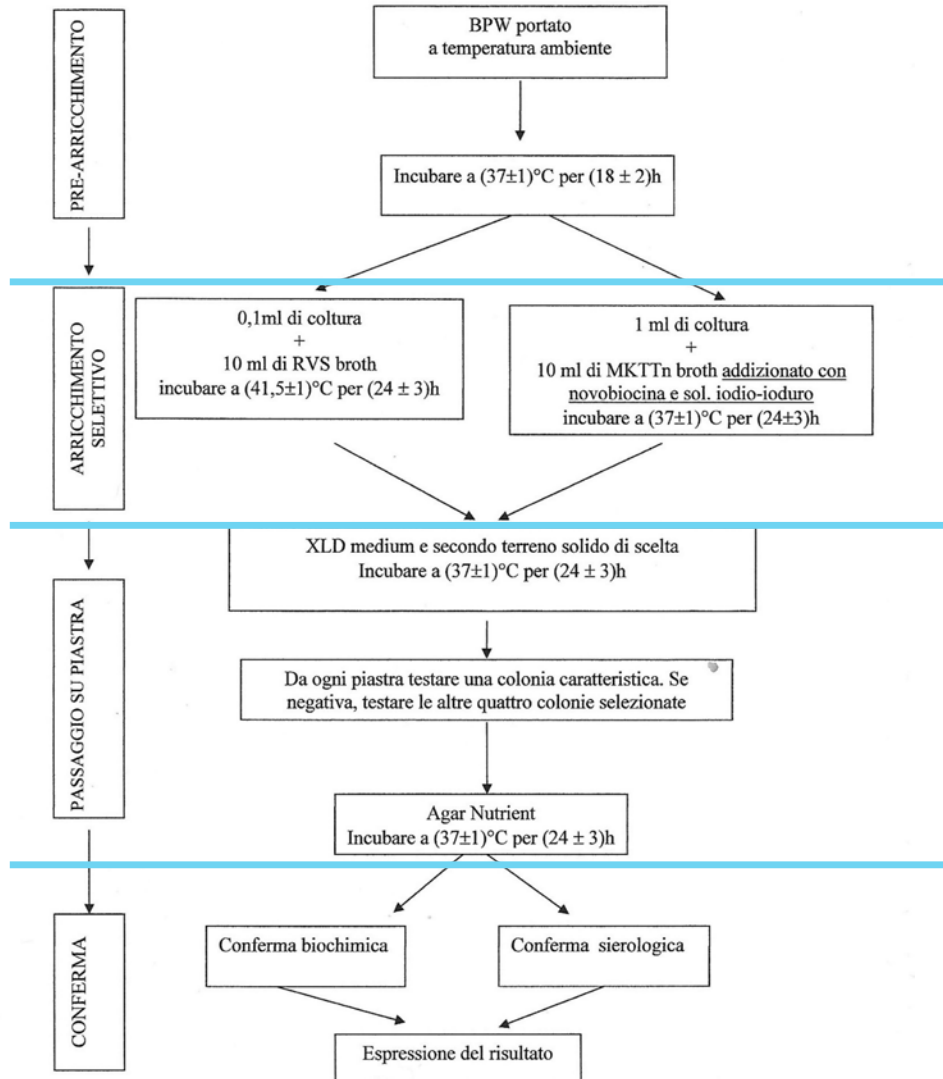


- Bacilli Gram -
- Asporigeni
- Anaerobi facoltativi
- Fermentano il glucosio producendo gas
- Degradano le proteine idrogeno solforate con produzione di H₂S
- Non fermentanti il lattosio
- Quasi tutti mobili per la presenza di flagelli peritrichi

SALMONELLA Spp: dove si ricerca

- PREPARATI A BASE DI CARNE DESTINATI AD ESSERE CONSUMATI COTTI E/O CRUDI
- PRODOTTI A BASE DI LATTE: formaggi, burro, panna, gelati
- PRODOTTI A BASE DI UOVA E ALIMENTI PRONTI CONTENENTI UOVA CRUDE
- CROSTACEI E MOLLUSCHI
- SEMI GERMOGLIATI
- FRUTTA E ORTAGGI PRETAGLIATI (pronti al consumo)
- ALIMENTI IN POLVERE PER LATTANTI

Diagramma di flusso *Salmonella* spp esame colturale



METODO COLTURALE PER LA RICERCA E IDENTIFICAZIONE DI SALMONELLA Spp: ISO 6579:2002

1) Pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo

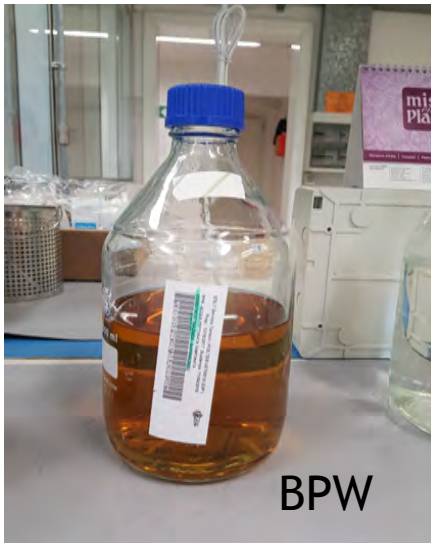
BPW: acqua
peptonata tamponata

- Prelevare sterilmente dall'alimento 25 gr/25 ml di campione
- Aggiungere 225 ml di BPW, in modo da rispettare la diluizione 1/10, e omogenare con lo stomacher il campione
- Incubare a 37° C per 24 h



Sacchetti presto-chiuso

1) Pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo



BPW



Stomacher

2) Arricchimento in terreno liquido selettivo



RVS: Rappaport Vassiliadis Soya broth

MKTTn: Muller-Kauffmann al tetrionato + novobiocina

0,1 mL

1 mL

RVS

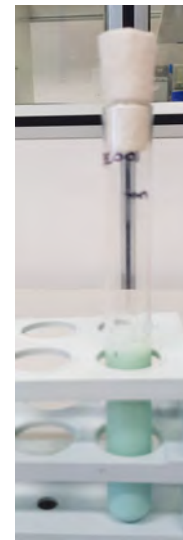
Agente selettivo:
cloruro di magnesio



41,5° C per 24 h

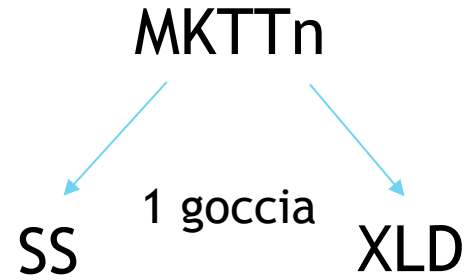
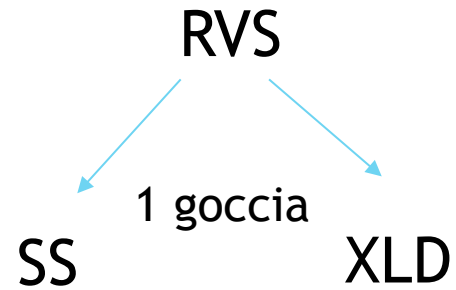
MKTTn

Agente selettivo:
Sali biliari

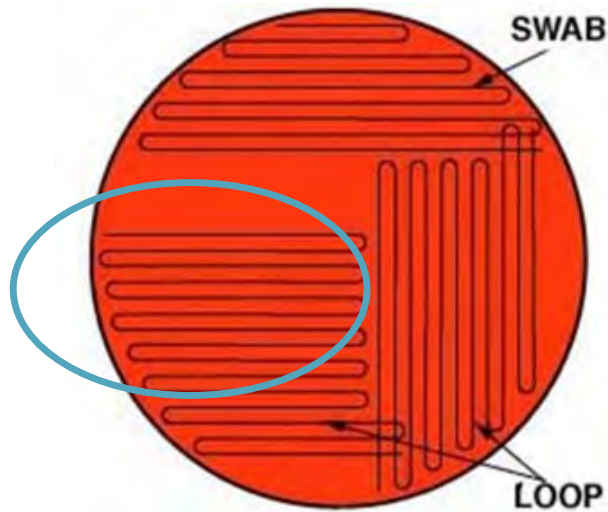


37° C per 24h

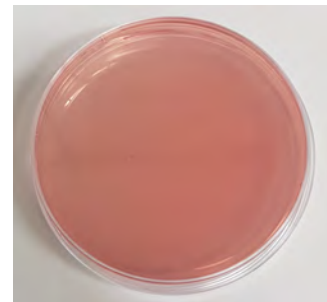
3) Semina in piastra e identificazione



Semina per isolamento



XLD: Xilosio Lisina
Desossicolato Agar → 37° C per 24h



SS: Salmonella
Shighella Agar → 37° C per 24h

3) Semina in piastra e identificazione

XLD e SS sono due terreni selettivi

XLD (Xilosio Desossicolato Agar): consente una differenziazione degli enterobatteri sulla base della fermentazione dello xilosio, della decarbossilazione della lisina e della produzione di H₂S.

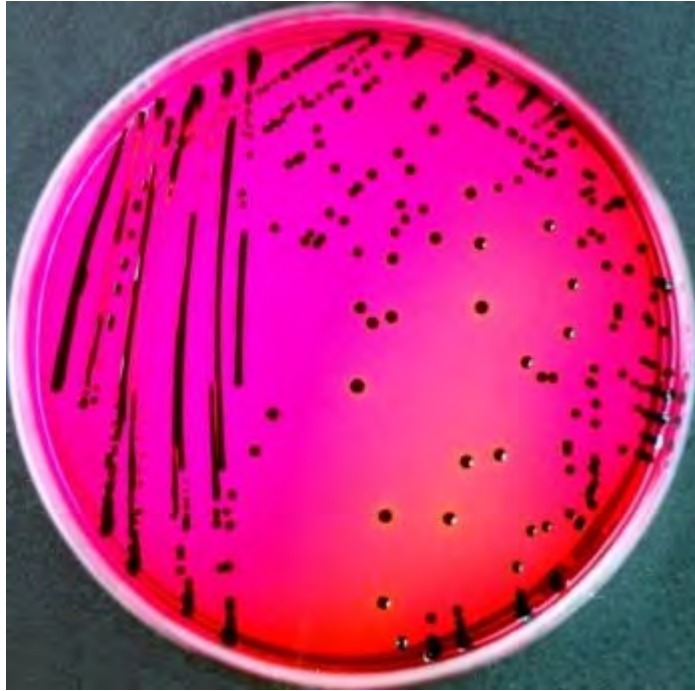
Il sodio desossicolato inibisce la crescita dei microrganismi Gram positivi, il rosso fenolo è presente come indicatore di pH, il ferro ammonio citrato come indicatore della produzione di idrogeno solforato

SS (Salmonella Shighella Agar): contiene un'elevata concentrazione di Sali biliari per cui è in grado di inibire la crescita della maggior parte dei coliformi nonché di Gram+ e Gram-, ma non della Salmonella.

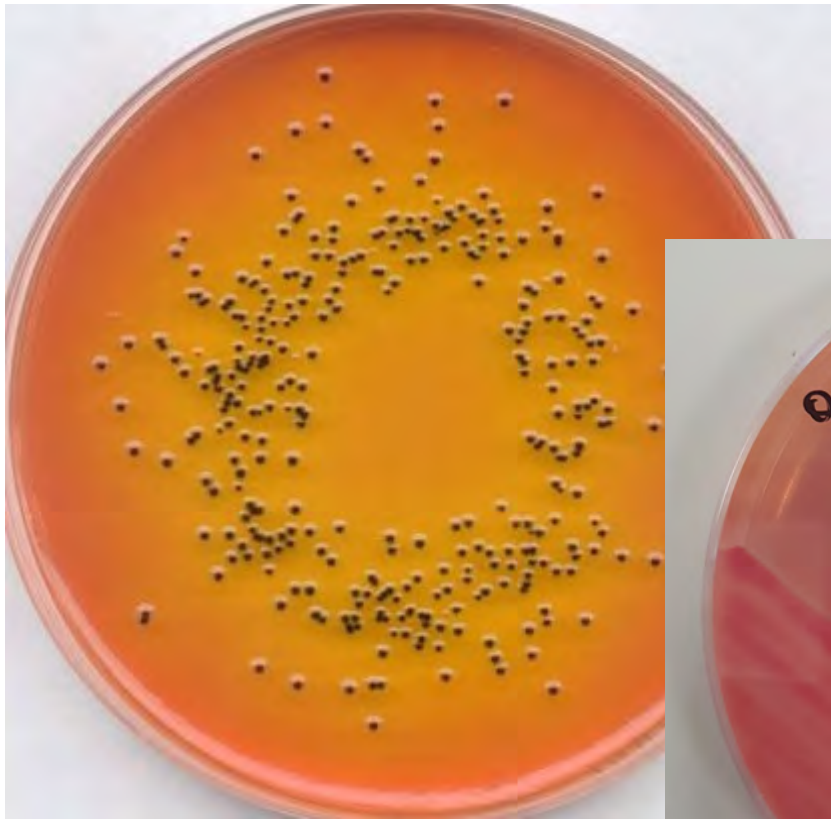
Contiene come unica fonte di carboidrati il lattosio e come colorante il rosso neutro, che vira al rosso quando il pH scende al di sotto di 6,8.

I microrganismi quindi in grado di fermentare il lattosio si presentano in piastra con colonie rosse.

3) Semina in piastra e identificazione



3) Semina in piastra e identificazione



Salmonella su SS si presenta con colonie tipiche:

- Piccole e incolori, dovuto al fatto che questo terreno contiene come unica fonte di carboidrati il



atteri che lo
minano una

essa in

neutro e

esse

atteristico

alla sua

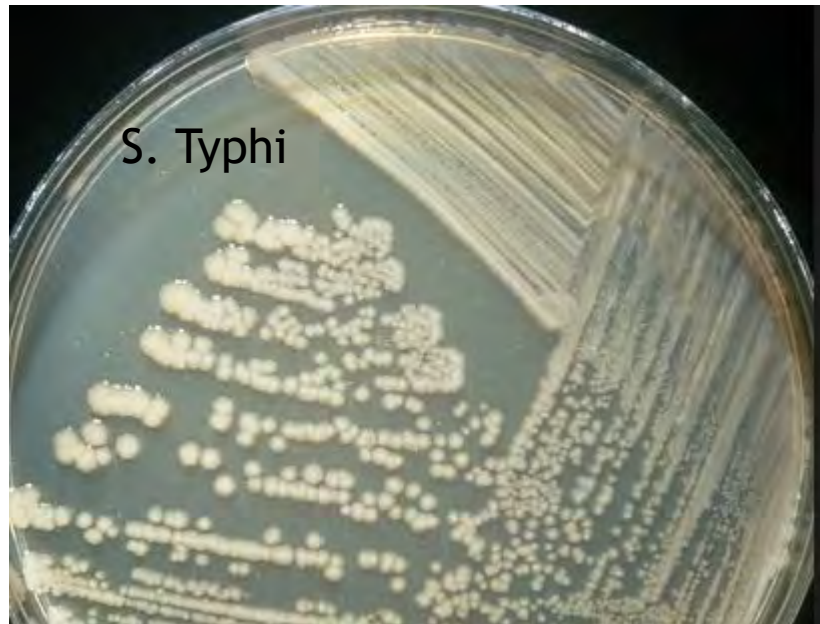
H₂S in questo

dal tiosolfato

4) Isolamento per le prove di conferma

- Prelevare da ogni piastra di ciascun terreno selettivo 5 colonie tipiche o sospette
- Seminare le colonie selezionate su NA e incubare a **37°C per 24h**

NA: Nutrient
Agar



4) Conferma biochimica: Macrometodi, TSI (Triple Sugar Iron Agar)

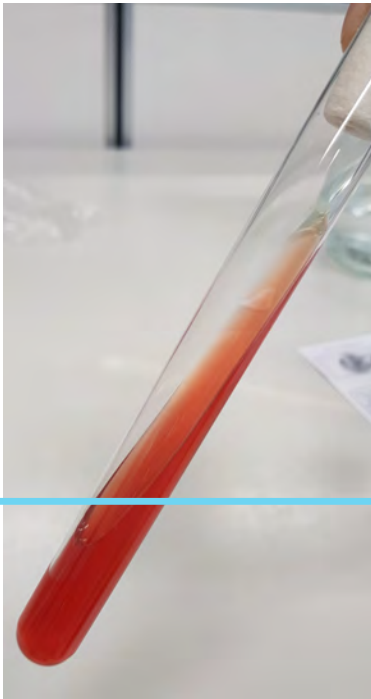
- Utilizzando un ago da inoculazione seminare per strisciamento una colonia prelevata da NA, la superficie inclinata a «becco di clarino» e per infissione il fondo della provetta
- Incubare a 37° C x 24h



Terreno selettivo utilizzato per l'identificazione della Salmonella, in base alla fermentazione di Lattosio, Glucosio e Saccarosio, alla produzione di idrogeno solforato e anidride carbonica. La fermentazione dei vari zuccheri è evidenziata da un cambiamento di colore dal rosso al giallo del rosso fenolo

4) Conferma biochimica: Macrometodi, TSI (Triple Sugar Iron Agar)

Interpretazione dei risultati



Superficie inclinata

- gialla: lattosio e/o saccarosio positivi
- Rossa/nessun cambiamento di colore: lattosio e saccarosio negativi

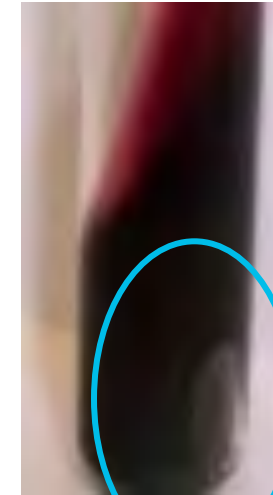
Fondo della provetta

- giallo: glucosio positivo
- rosso/nessun cambiamento di colore: glucosio negativo
- Nero: formazione di idrogeno solforato, per utilizzazione di aa solforati
- Bolle/spaccature: produzione di gas dal glucosio

4) Conferma biochimica: Macrometodi, TSI (Triple Sugar Iron Agar)

Le colture tipiche di Salmonella danno:

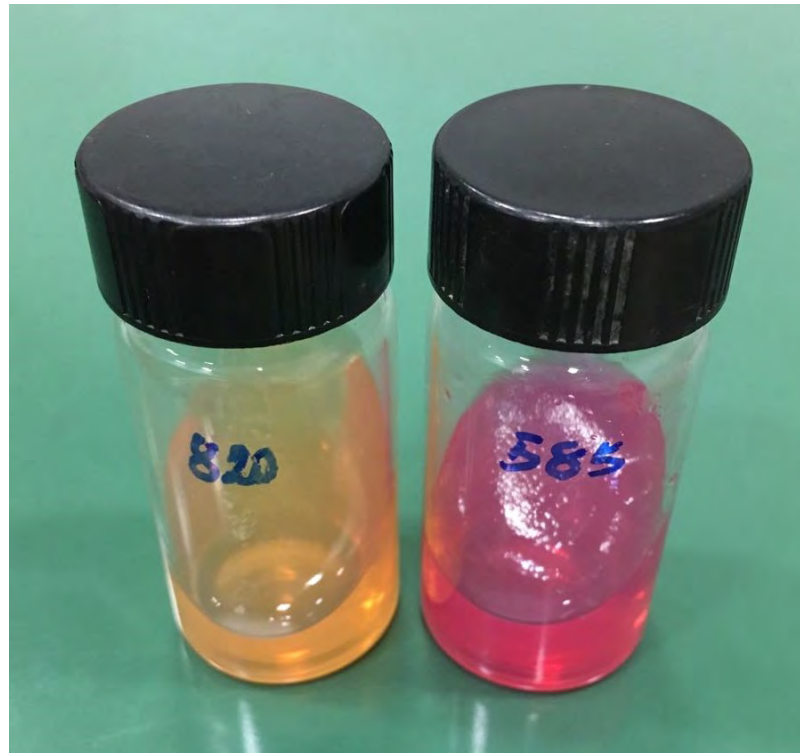
- Una superficie inclinata rossa (reazione alcalina)
- Un fondo della provetta giallo (reazione acida) con formazione di gas
- Oltre a formazione, nel 90% dei casi di H₂S con annerimento del terreno



ECCEZIONI: S. Paratyphi A non produce H₂S

ca: Macrometodi,

prelevata
o Urea



4) Conferma biochimica: Api 20 E

- Sistema di identificazione degli Enterobatteri
- Consiste di 20 microtubi, che mimano i test biochimici, contenenti terreni disidratati
- I singoli test vengono inoculati con una sospensione batterica che ricostituisce i terreni
- Al termine della preparazione si mette ad incubare a **37°C per 24h**

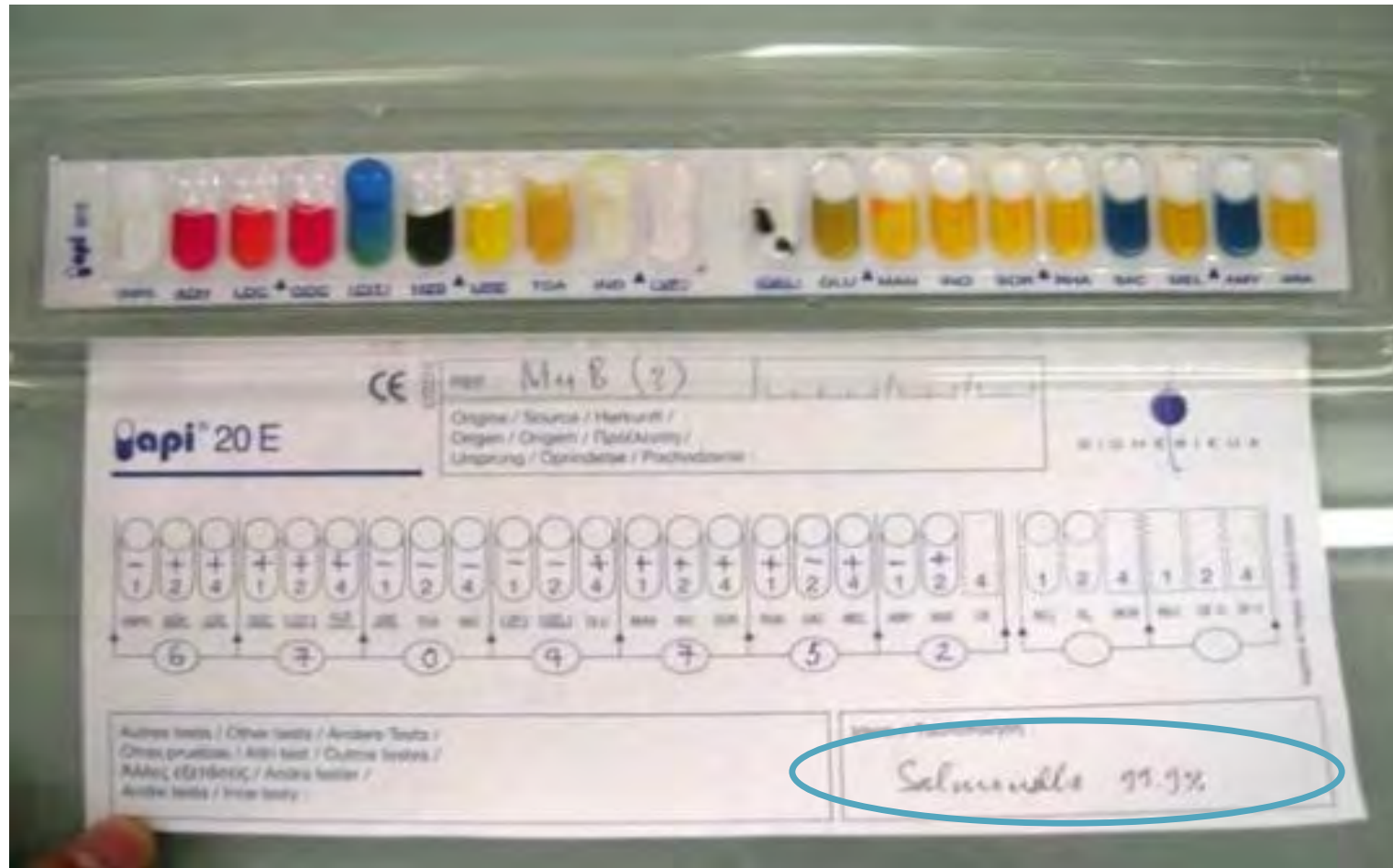


TABELLA DI LETTURA

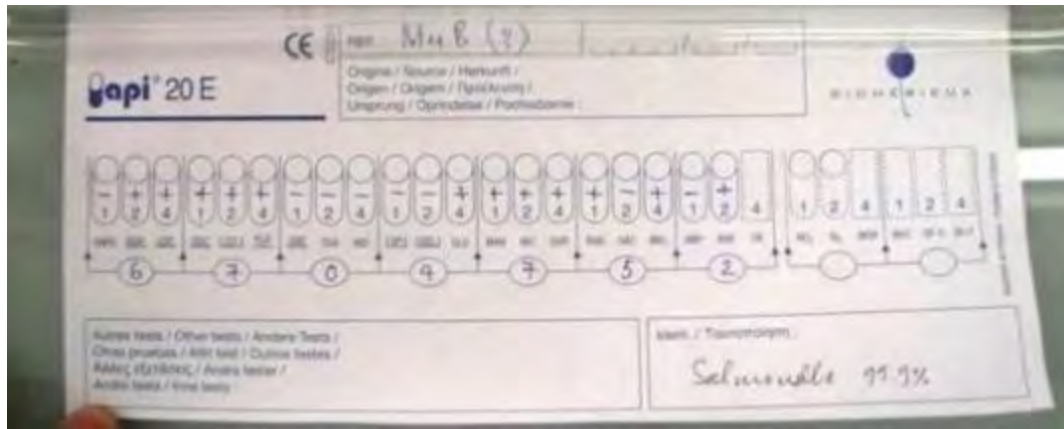
TESTS	SUBSTRATI	Q.TA'	REAZIONI/ENZIMI	RISULTATI	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	orto-nitro-fenil-β-D-galattopiranoside (ONPG) isopropiltiogalattopiranoside (IPTG)	0,23 mg	beta-galattosidasi	incolore	giallo (1)
		7,6 µg			
ADH	arginina	1,9 mg	arginina deidrolasi	giallo	rosso / arancio (2)
LDC	lisina	1,9 mg	lisina decarbossilasi	giallo	rosso / arancio (2)
ODC	ornitina	1,9 mg	ornitina decarbossilasi	giallo	rosso / arancio (2)
CIT	citrato di sodio	0,83 mg	utilizzo del citrato	verde chiaro / giallo	blu-verde / blu (3)
H ₂ S	fosfato di sodio	76,0 µg	produzione di H ₂ S	incolore / grigiastro	deposito nero / orlo sottile
URE	urea	0,76 mg	ureasi	giallo	rosso / arancio (2)
TDA	triptofano	0,38 mg	triptofano deaminasi	TDA / immediato	
				giallo	marrone-rossastro
IND	triptofano	0,19 mg	produzione di indolo	JAMES / immediato	
				incolore verde chiaro / giallo	rosa
VP	creatina piruvato di sodio	0,38 mg	produzione di acetoina	VP 1 + VP 2 / 10 min.	
		1,9 mg		incolore	rosa / rosso (5)
GEL	gelatina di Kohn	0,17 mg	gelatinasi	non diffusione	diffusione del pigmento nero
GLU	glucosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo / giallo grigio
MAN	mannitolo	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
INO	inositolo	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
SOR	sorbitolo	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
RHA	ramnosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
SAC	saccarosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
MEL	melibiosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
AMY	amigdalina	0,57 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
ARA	arabinosio	1,9 mg	fermentazione / ossidazione (4)	blu / blu-verde	giallo
OX	(vedere foglietto illustrativo del test ossidasi)		citocromo-ossidasi	(vedere foglietto illustrativo del test ossidasi)	
Riduzione dei nitrati provetta GLU	nitrato di potassio	76,0 µg	produzione di NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min.	
				giallo	rosso
			riduzione allo stadio N ₂	Zn / 5 min.	
				arancione-rosso	giallo
MOB	API M Medium o microscopio		mobilità	immobile	mobile
McC	terreno di MacConkey		cultura	assenza	presenza

4) Conferma
biochimica:
Api 20 E

4) Conferma biochimica: Api 20 E



4) Conferma e sierotipizzazione



I ceppi identificati mediante test biochimici come Salmonella sono trasferiti presso **Centri di riferimento per gli enterobatteri patogeni** per la sierotipizzazione completa

Coliformi fecali, Enterobacteriacee indice di contaminazione fecale

- Citrobacter
- Coli
- Enterobacter

Sono un sottogruppo dei coliformi totali e rappresentano un indice più specifico di contaminazione fecale delle acque e degli alimenti

E.Coli: principale indicatore di contaminazione fecale



E.Coli: principale indicatore di contaminazione fecale



Citrobacter

Insieme ad altri, fa parte di un gruppo di microrganismi definiti **ORGANISMI ALTERATIVI SPECIFICI**, in quanto durante la conservazione crescono rapidamente e producono odori e sapori anomali associati con l'alterazione



Citrobacter su AS

Citrobacter



Enterobacter Sakazakii



Cronobacter, la cui ricerca in alimenti in polvere per lattanti e prodotti dietetici è prevista dalla 2073 ed è descritta nella ISO 22964

Altri batteri contaminanti: Proteus, Pseudomonas



Proteus su XLD

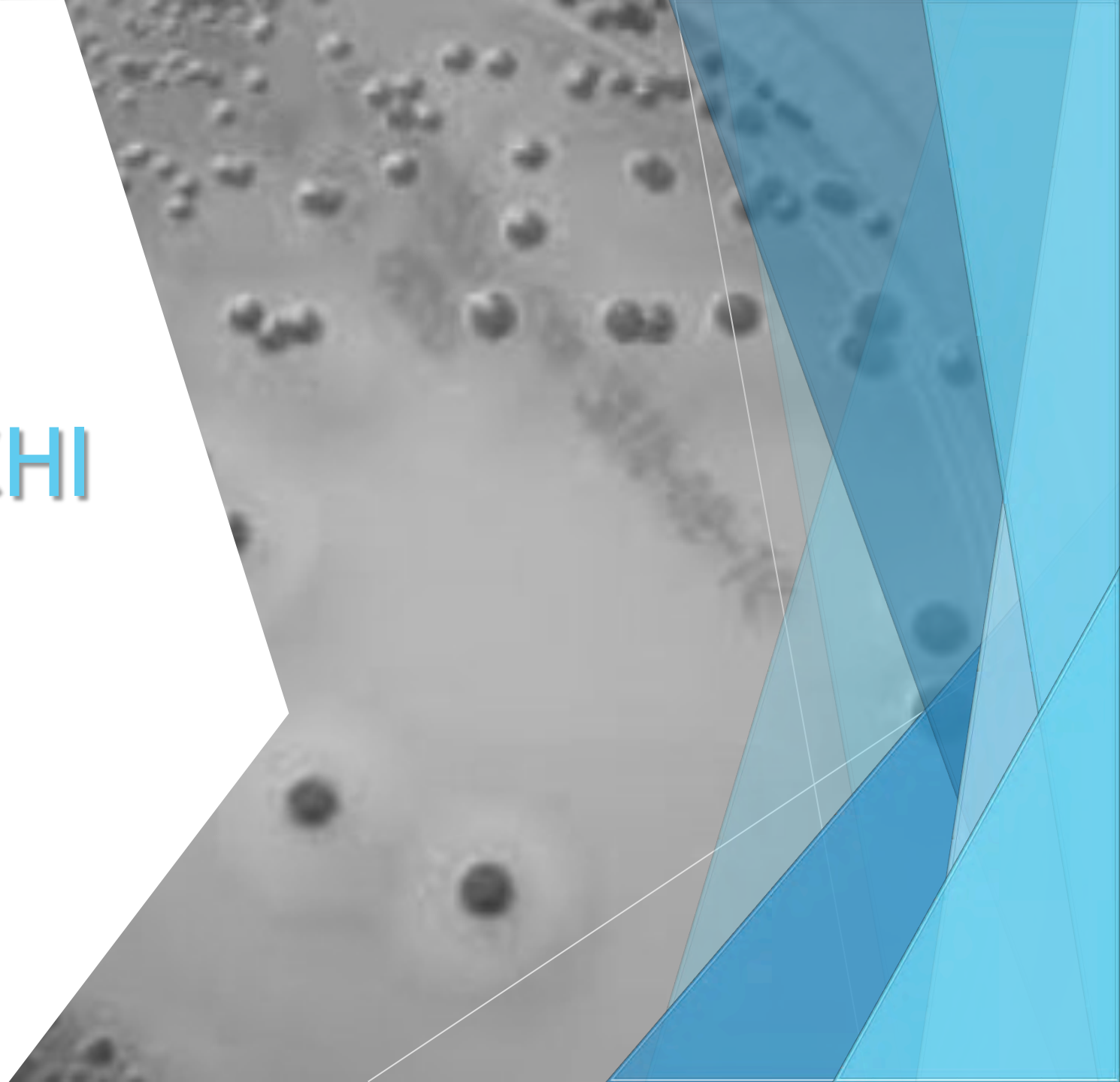


Proteus su AS

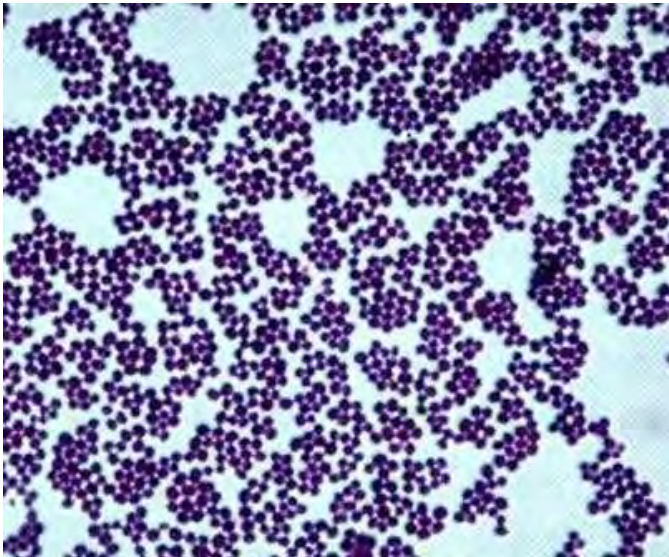


Pseudomonas su AS

STAPHYLOCOCCHI COAGULASI POSITIVI



STAPHYLOCOCCCHI COAGULASI POSITIVI

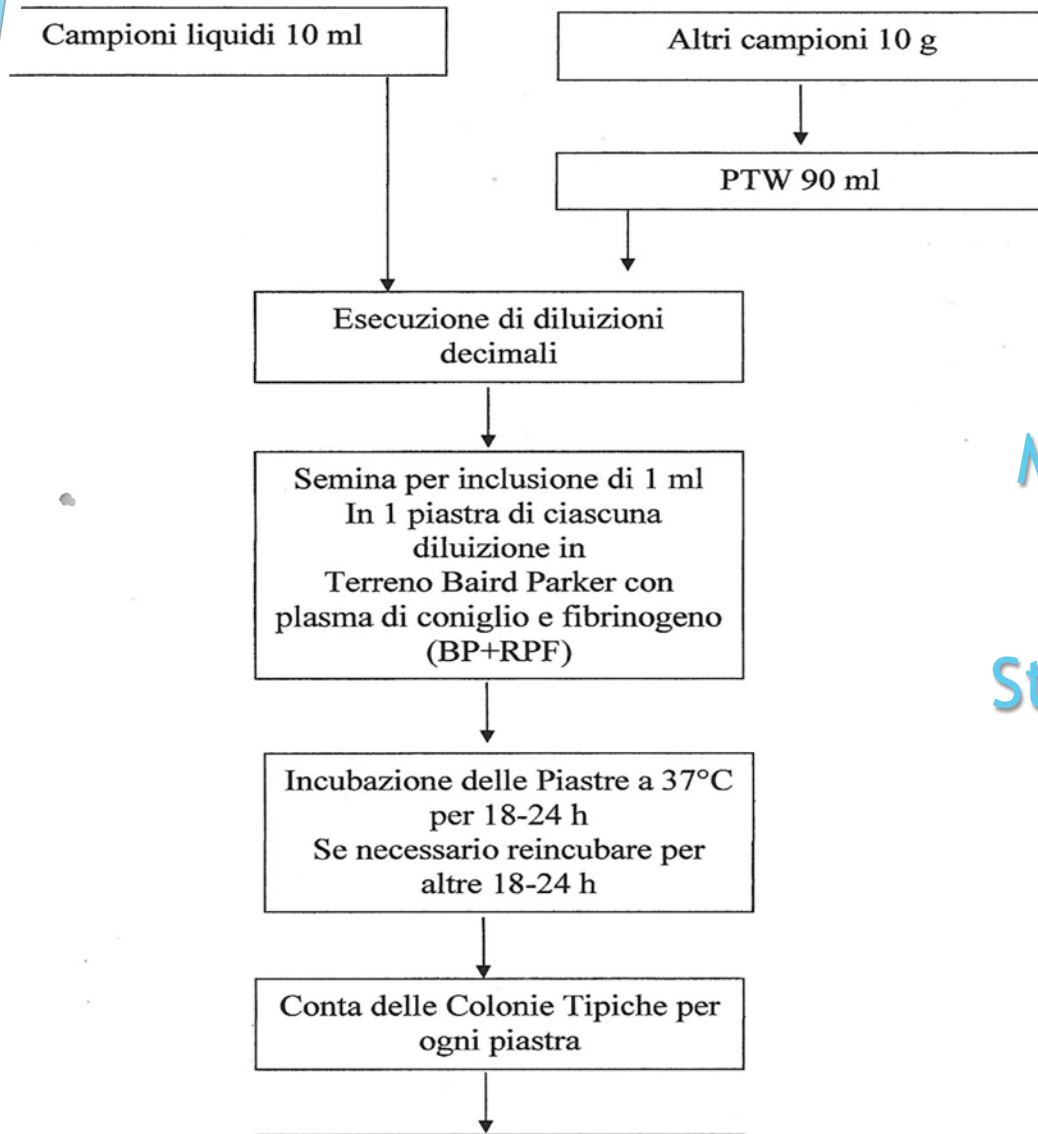


- Appartengono alla famiglia delle Staphylococcaceae
- Sono batteri Gram+ e catalasi +
- Di forma sferica
- Immobili e privi di capsula evidente
- Aerobi e anaerobi facoltativi
- Hanno la caratteristica di disporsi in natura a grappolo in gruppi irregolari
- Alcuni **biotipi appartenenti alla specie S. Aureus sono responsabili di tossinfezioni alimentari** per la loro capacità di produrre enterotossine termoresistenti e attive per ingestione

STAPHYLOCOCCHI COAGULASI +: dove si ricercano (ISO 6888)

2.2.3. Formaggio a base di latte crudo	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	10 ⁴ ufc/g	10 ⁵ ufc/g	EN/ISO 6888-2	Fase del processo di lavorazione in cui si prevede che il numero degli stafilococchi sia il più alto	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime. Se si rilevano valori > 10 ⁵ ufc/g, la partita di formaggio deve essere sottoposta alle prove sulle enterotossine stafilococciche
2.2.4. Formaggi a base di latte sottoposto a trattamento termico a temperatura inferiore a quella della pastorizzazione (7) e formaggi stagionati a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a temperatura più elevata (7)	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	EN/ISO 6888-1 o 2		
2.2.5. Formaggi a pasta molle non stagionati (formaggi freschi) a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a temperatura più elevata (7)	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO 6888-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione. Se si rilevano valori > 10 ⁵ ufc/g, la partita di formaggio deve essere sottoposta alle prove sulle enterotossine stafilococciche

Diagramma di Flusso
Stafilococchi coagulasi positivi
(Staphylococcus aureus ed altre specie)
(Esame colturale - UFC)

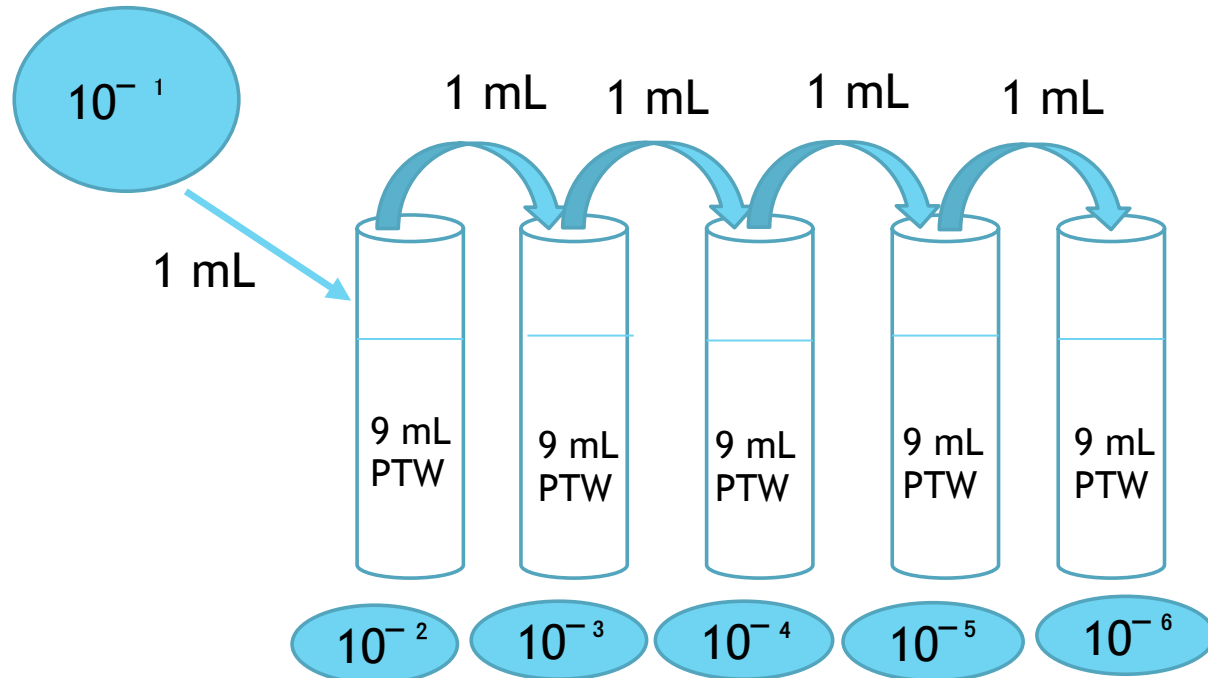


**METODO COLTURALE UFC
PER LA RICERCA E
IDENTIFICAZIONE DI
Stafilococchi coagulasi+:
ISO 6888**

METODO CULTURALE PER LA RICERCA E IDENTIFICAZIONE DI STAPHYLOCOCCCHI COAGULASI+:

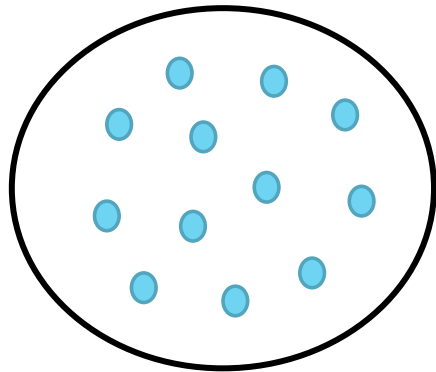
preparazione del campione e delle diluizioni

- Prelevare sterilmente 10 gr/10 mL di campione
- Aggiungere 90 mL di PTW, rispettando sempre il rapporto 1/10 (10^{-1})
- Omogenare il campione in stomacher
- Allestire le diluizioni decimali



METODO CULTURALE PER LA RICERCA E IDENTIFICAZIONE DI STAPHYLOCOCCHI COAGULASI+: allestimento delle piastre

- Per ogni diluizione si preparano delle piastre petri sterili
- Dispensiamo 1 mL di sospensione
 - Semina per inclusione
 - Aggiunta del terreno BP +RPF supplement



Semina per inclusione + terreno



37° C per 48 h

BP: Baird Parker Agar, contiene agenti selettivi (cloruro di litio e tellurito di potassio) per inibire la crescita di microrganismi contaminanti e glicina e piruvato di sodio che facilitano la crescita degli stafilococchi

RPF supplement, contiene plasma di coniglio e fibrinogeno, per evidenziare attività coagulastica, e inibitore della fibrinolisi

METODO COLTURALE PER LA RICERCA E IDENTIFICAZIONE DI STAPHYLOCOCCHI COAGULASI+:

allestimento delle piastre



METODO COLTURALE PER LA RICERCA E IDENTIFICAZIONE DI STAPHYLOCOCCCHI COAGULASI+:

Conta delle colonie tipiche



Staphylococchi coagulasi + su BP+RPF supplement: formano piccole colonie nere o grigie (dovute alla riduzione del tellurito a tellurio) circondate da un alone di precipitazione indicante l'attività coagulastica

METODO COLTURALE PER LA RICERCA E IDENTIFICAZIONE DI STAPHYLOCOCCCHI COAGULASI+:

Conta delle colonie tipiche

Poiché il terreno al plasma di coniglio e fibrinogeno è basato sulla reazione della coagulasi, **non** è necessario procedere con esami di conferma, si passa direttamente alla conta delle colonie tipiche.

- Si selezionano due piastre, di **due diluizioni successive**, contenenti al massimo **150 colonie totali**;
- Si calcola il numero (**N**) degli staphylococchi coagulasi positivi **per gr o mL di prodotto**, come media ponderata dalle due diluizioni successive applicando la seguente formula

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

→ (è uguale alla somma delle colonie tipiche contate nelle due piastre)

→ V= volume di inoculo in millimetri
d= diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata
1,1= fattore di conversione

METODO COLTURALE PER LA RICERCA E IDENTIFICAZIONE DI STAPHYLOCOCCHI COAGULASI+:

Conta delle colonie tipiche

Es: il conteggio di un campione dopo semina con 1 ml di inoculo fornisce il seguente risultato:

- ✓ Per la prima diluizione selezionata (10^{-2}): 66 colonie tipiche
- ✓ Per la seconda diluizione selezionata (10^{-3}): 4 colonie tipiche

$$N = \frac{66+4}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = 6.363,63 = 6,4 \times 10^3$$

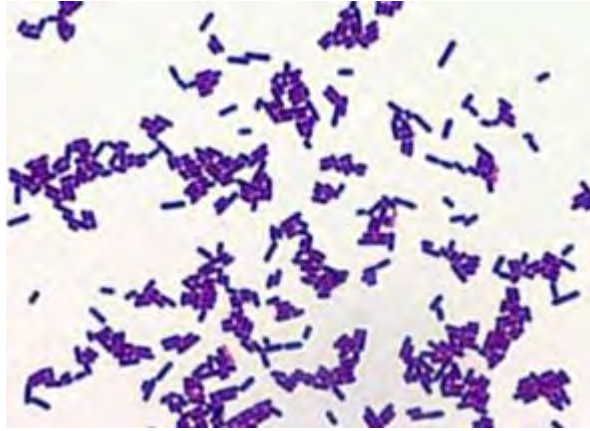
Ammettendo di aver avuto un campione di formaggio a base di latte crudo il risultato è **CONFORME:**

limite di legge stabilito dalla ISO 6888 è di 10^5 ufc/gr



LISTERIA MONOCYTOGENES

LISTERIA MONOCYTOGENES



- Bacilli Gram+
- Asporigeni
- Aerobi-anaerobi facoltativi
- Mobili per la presenza di flagelli peritrichi
- Catalasi+ e ossidasi-

Si tratta di un batterio presente nel suolo, nell'acqua e nella vegetazione. L'ubiquitarietà di questi microrganismi nell'ambiente naturale ne permette la diffusione alle materie prime di origine animale e vegetale utilizzate nell'industria alimentare e quindi la trasmissione all'uomo tramite alimenti contaminati

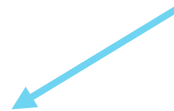
Tossinfezioni alimentari

Listeria Spp e Listeria Monocytogenes: ISO 11290:2017

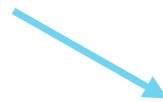
Il metodo di ricerca si applica a tutti gli alimenti per l'uomo e per gli animali ed ai campioni prelevati da ambienti di produzione e manipolazione di alimenti



ISO 11290: 2017 METODO ORIZZONTALE PER LA RICERCA E LA
CONTA DI LISTERIA MONOCYTOGENES E LISTERIA Spp



Parte 1: Metodo di
ricerca



Parte 2: Metodo per
la conta UFC

Annex A (normative)

Diagram of procedure

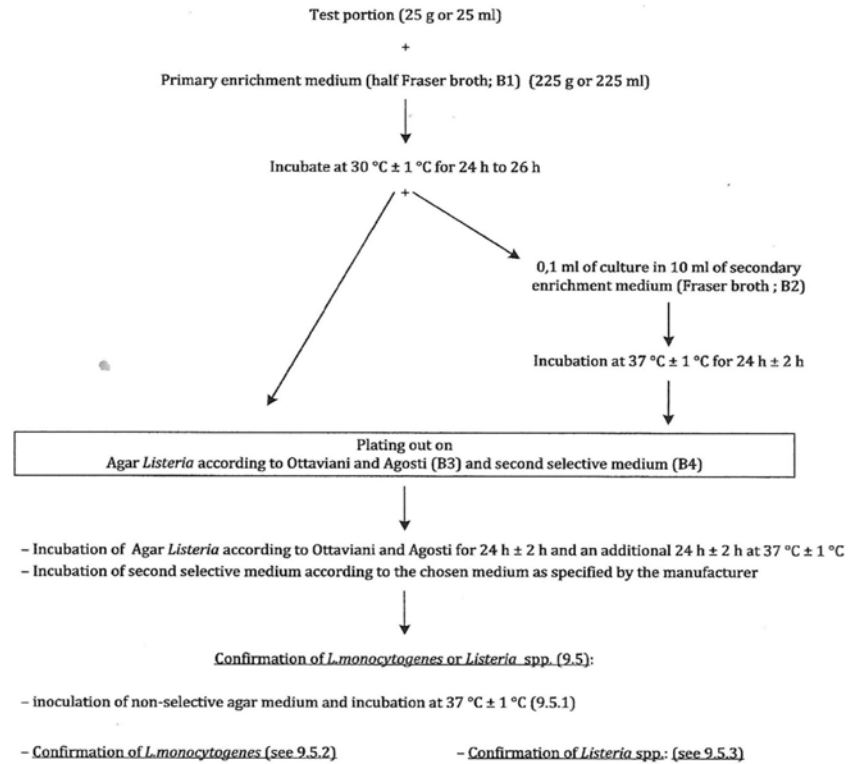


Figure A.1 — Diagram of procedure

ISO 11290-1

Metodo orizzontale per Ricerca di *Listeria* Spp e *Listeria* *Monocytogenes*

1) Prelievo e arricchimento primario

- Prelevare sterilmente dall'alimento 25 gr/25 ml di campione
- Aggiungere 225 ml di HFB, in modo da rispettare la diluizione 1/10, e omogenare con lo stomacher il campione
- Incubare a 30° C per 24 h

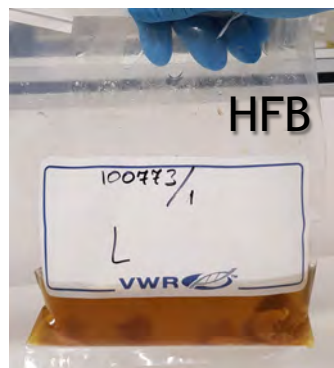
HFB: Half Fraser Broth, per il recupero di Listerie poco vitali

2) Arricchimento secondario

ALOA: Agar Listeria
accordung Ottaviani
and Agosti

LSM: Oxford Agar

FB: Fraser Broth



0,1 mL

(Subcultura)

Semina in piastra per isolamento in
due terreni solidi selettivi



Incubazione a 37° C x24h

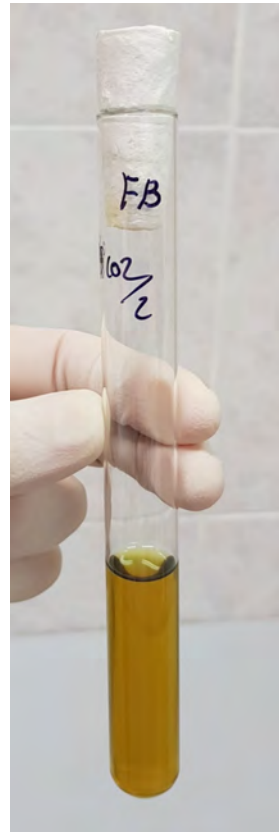
ALOA

LSM

Incubazione 37° x 48h

3) Semina in piastra ed identificazione

In questa fase possiamo individuare la presenza presuntiva di *Listeria*, indicata dall'**annerimento** di FB

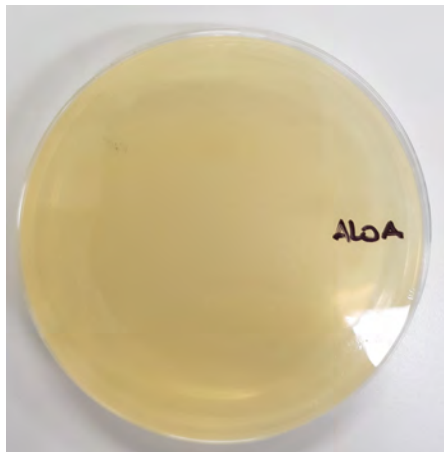


Dovuto alla reazione dell'esculetina, prodotta dall'idrolisi dell'esculina con gli ioni ferro (Ferro ammonio citrato)

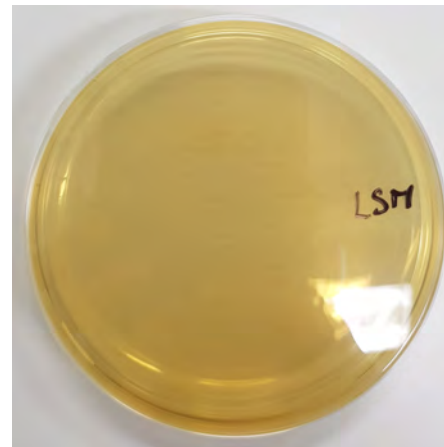
3) Semina in piastra ed identificazione

- Dal terreno di arricchimento secondario (FB) prelevare mediante un'ansa sterile una porzione di coltura e seminare in due terreni solidi selettivi (ALOA e LSM) in modo da ottenere delle colonie isolate

Incubare
37°C x 48h



Semina per
isolamento



Incubare
37°C x 48h

3) Semina in piastra ed identificazione



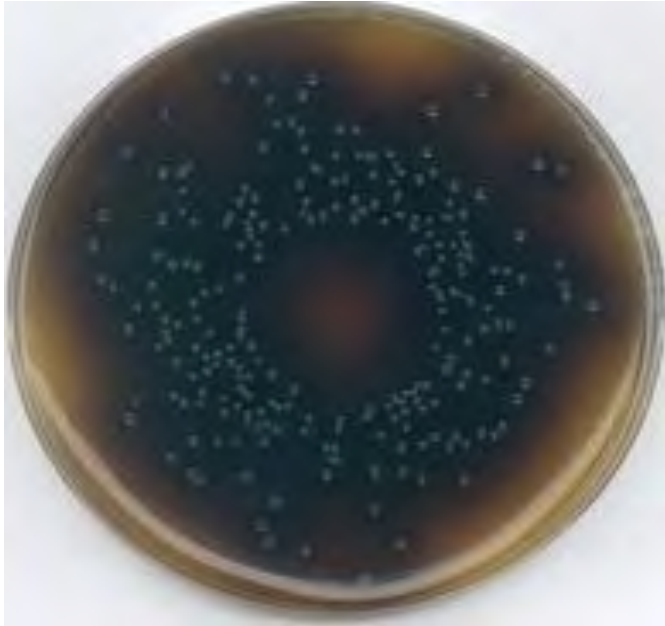
Listeria Monocytogenes su ALOA:
presenta con colonie verde-blu
circondate da un alone opaco dovuto
alla sua attività Phosphatidyl Inositol
Phospholipase C

Il terreno ALOA contiene due agenti
selettivi:

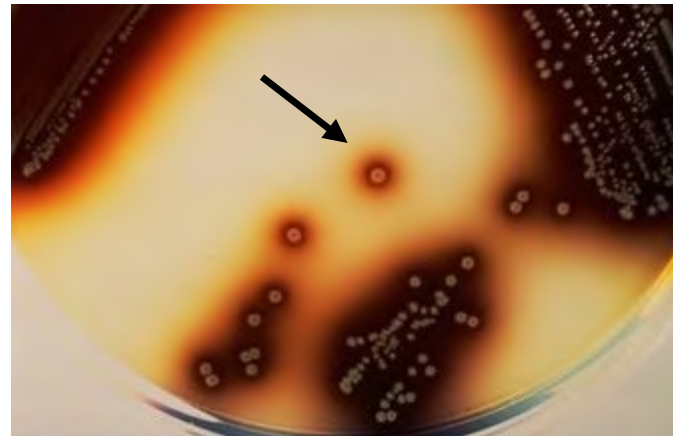
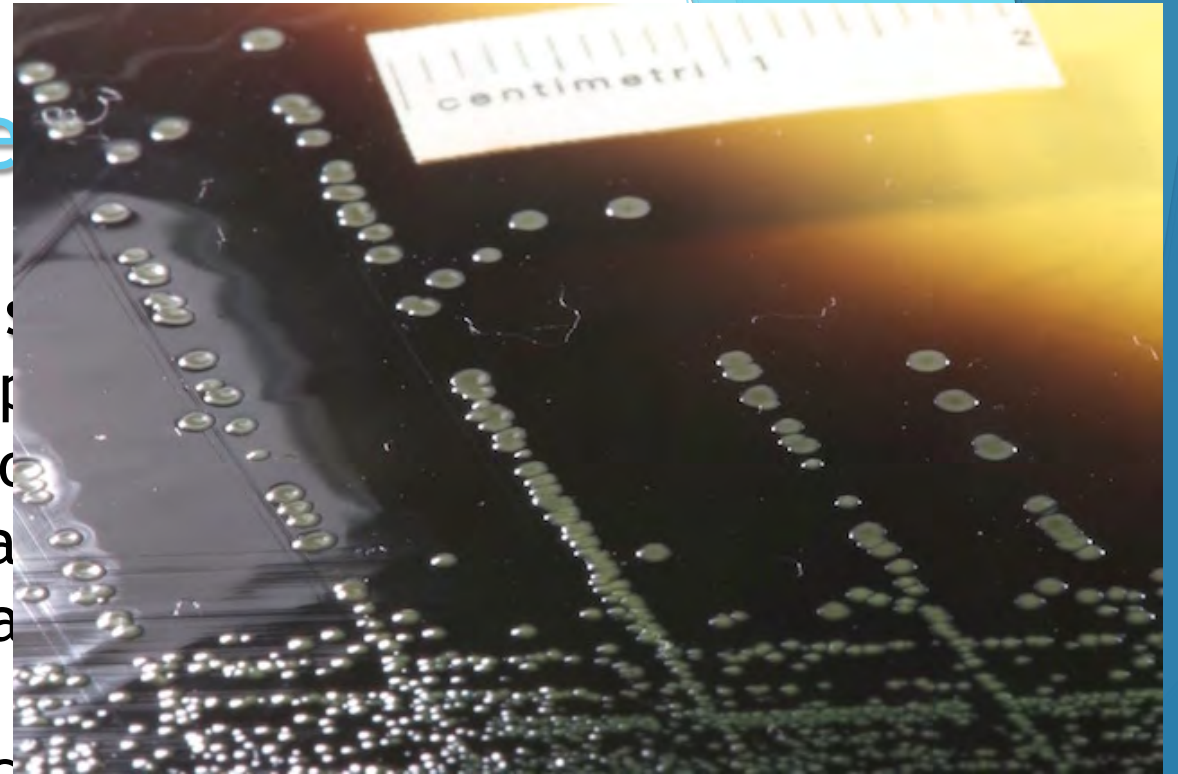
- X-Glucopiranoside, substrato per la β -glucosidasi → colonie verdi-blu
- Fosfatidilinositolo, substrato per la fosfolipasi → alone opaco intorno alle colonie

ATTENZIONE: Listeria Spp non ha attività fosfolipasica, non mostra alone intorno alla colonia e a volte anche Listeria M. in particolari condizioni di stress mostra una lenta attività fosfolipasica

3) Semina in piastra ed ide



Listeria s
colonie p
diametro
circonda
dovuto a
Talvolta
ombellicata al centro

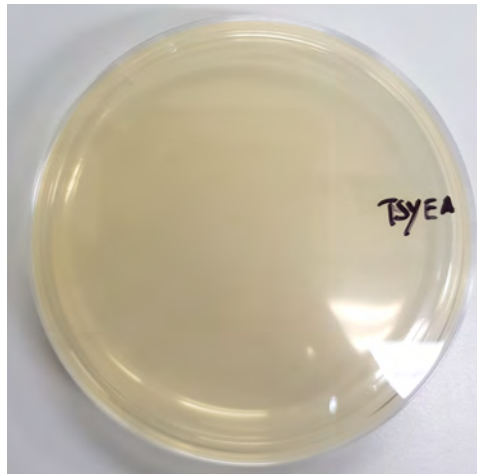


4) Conferma di *Listeria Spp*

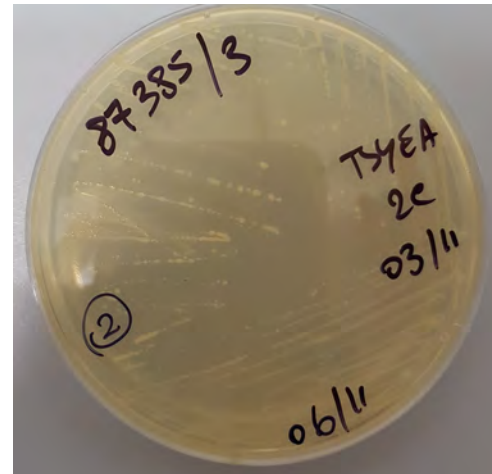
TSYEA: Triptone
Soya Yeast Extract
Agar

- Per la conferma prendere da ogni terreno selettivo 5 colonie riferibili a *Listeria Spp* e si seminano per isolamento sulla superficie di un terreno nutritivo, TSYEA, in modo da ottenere colonie colonie isolate

N.B. 1 piastra per ogni colonia selezionata



Incubare a
37° C x 24 h



Coltura pura

TSYEA: le colonie tipiche si presentano 1-2 mm di diametro, incolori, opache, a margini regolari

4) Conferma di *Listeria Spp*

- Prelevare delle colonie da una coltura pura di TSYEA ed eseguire i 2 test di conferma raccomandati dalla ISO

Table 2 — Confirmation tests for *Listeria spp*

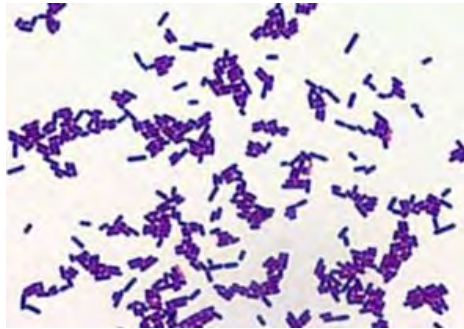
Tests	<i>Listeria spp.</i>	Results
Mandatory	Microscopic aspect (9.5.2.2)	Slim short rods or coccobacilli
	Catalase (9.5.2.2)	+
Optional	VP test (9.5.3.5)	+
	Motility at 25°C (9.5.2.3)	+



Ad es: anche l'Enterococcus si presenta su ALOA con colonia simile a *Listeria SPP*, senza alone intorno alla colonia, ma mostra caratteristiche biochimiche e morfologiche differenti (Cocchi, catalasi-)

4) Conferma di Listeria Spp

1) Colorazione di Gram



Listeria Spp, si presenta come bacilli Gram+ corti e sottili

2) Reazione della catalasi, sospendere la colonia isolata in una goccia di perossido di idrogeno al 3%; lo sviluppo immediato di bolle di gas indica una reazione positiva

Bacilli Gram+
Catalasi +



**CONFERMA
LISTERIA Spp**

Si procede quindi con le prove di conferma per Listeria Monocytogenes

4) Conferma di *Listeria Monocytogenes*

Table 1 — Confirmation tests for *L. monocytogenes*

Tests	<i>L. monocytogenes</i> confirmation tests	Results
Mandatory	Microscopic aspect ^a (9.5.2.4)	Slim short rods or coccobacilli
	Beta-haemolysis (9.5.2.5)	+
	L-Rhamnose (9.5.2.7)	+
	D-Xylose (9.5.2.7)	-
Optional	Catalase (9.5.2.2)	+
	Motility at 25°C (9.5.2.3)	+
	CAMP test (9.5.2.5)	+

^a Microscopic aspect is optional for Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti and for the second medium if it allows distinction between pathogenic and non-pathogenic *Listeria* spp.

1) Colorazione di Gram

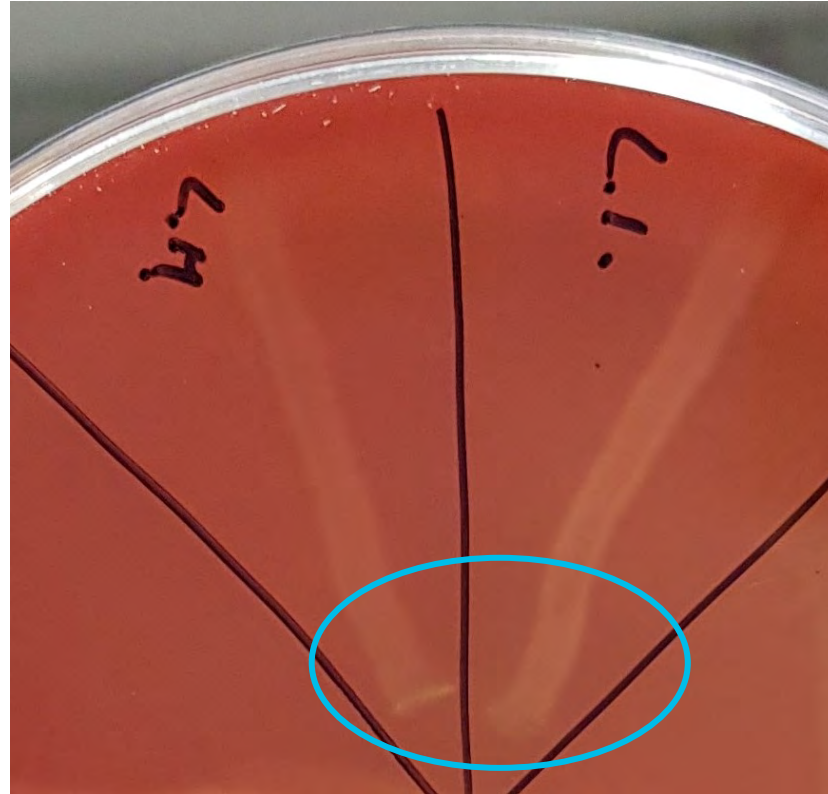
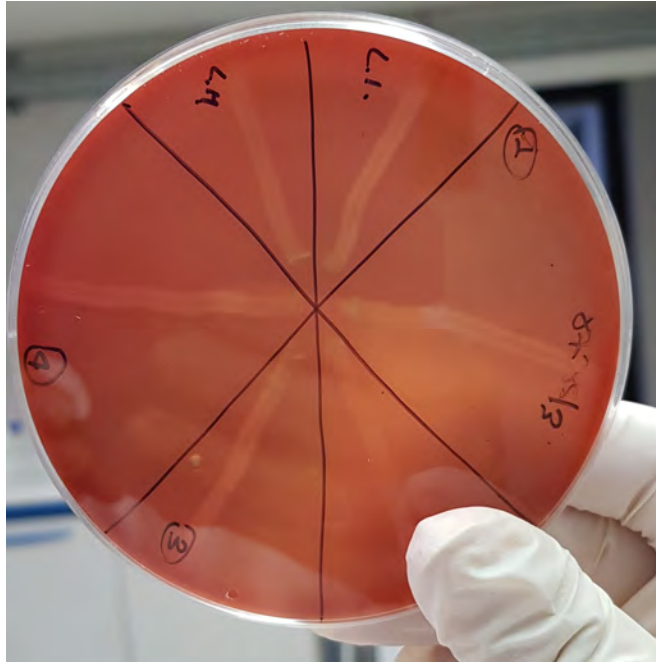
4) Conferma di *Listeria Monocytogenes*

2) Test dell'emolisi

- Prendere una colonia isolata da TSYEA ed usando un ago seminare per strisciamento e per infissione uno spazio per ogni colonia su ASLBC, per determinare la reazione emolitica
- Allo stesso modo si semina per infissione un controllo positivo, *Listeria Monocytogenes* e uno negativo, *Listeria Innocua*.
- Incubare a 37° C x 24 h

ASLBC: Sheep Blood Agar
per *Listeria* e *Bacillus*

4) Conferma di *Listeria Monocytogenes*



Listeria Monocytogenes, presenta una zona ristretta di leggera chiarificazione (β -emolisi) intorno al punto di infissione

4) Conferma di *Listeria Monocytogenes*

3) Utilizzazione dei carboidrati: R-Rhamnose e D-Xilose

- Inoculare mediante un'ansa i brodi per l'utilizzazione dei 2 carboidrati con una colonia precedentemente risospesa in TSYEB
- Incubare a 37° C fino a un max di 5 gg
- L'utilizzazione dei carboidrati è indicata da un colore giallo, reazione acida, che sopraggiunge per lo più entro le 24-48h.

TSYEB: Triptone Soya
Yeast Extract Broth

4) Conferma di *Listeria Monocytogenes*

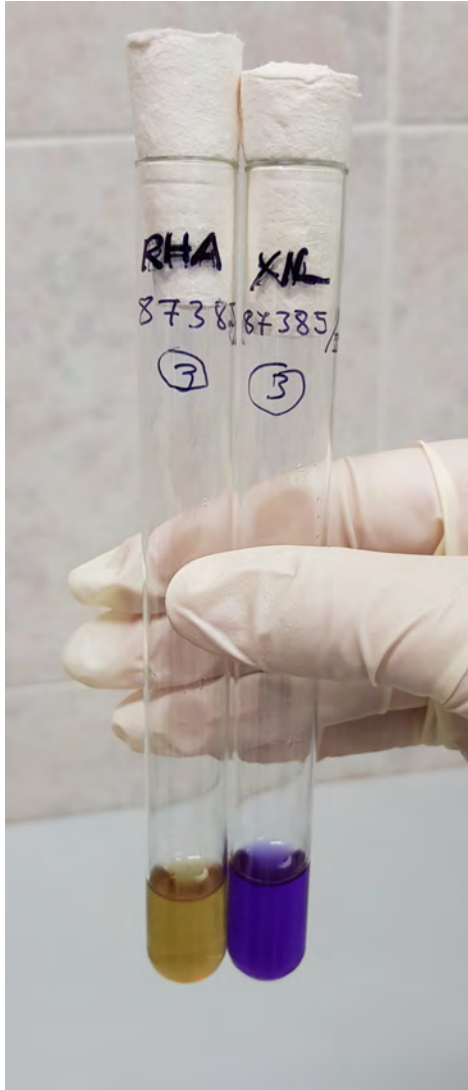


Table 1 — Confirmation tests for *L. monocytogenes*

Tests	<i>L. monocytogenes</i> confirmation tests	Results
Mandatory	Microscopic aspect ^a (9.5.2.4)	Slim short rods or coccobacilli
	Beta-haemolysis (9.5.2.5)	+
	L-Rhamnose (9.5.2.7)	+
	D-Xylose (9.5.2.7)	-
Optional	Catalase (9.5.2.2)	+
	Motility at 25°C (9.5.2.3)	+
	CAMP test (9.5.2.5)	+

^a Microscopic aspect is optional for Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti and for the second medium if it allows distinction between pathogenic and non-pathogenic *Listeria* spp.



**CONFERMA
LISTERIA
MONOCYTOGENES**



***GRAZIE
PER
L'ATTENZIONE***

