

## Principi di microbiologia selettiva e differenziale

Spesso nasce l'esigenza di isolare (separare) specifici microrganismi o gruppi di microrganismi dalla complessa microflora che popola un campione alimentare.

Specifici microrganismi o gruppi di microrganismi possono essere isolati dal loro habitat naturale creando in laboratorio condizioni ambientali artificiali che migliorano la loro crescita rispetto agli altri microrganismi competitori.

La creazione di condizioni favorevoli ad un solo organismo o gruppo di organismi è noto come **arricchimento**. L'obiettivo è quello di soddisfare da un lato le esigenze nutrizionali dell'organismo desiderato e dall'altro quello di inibire quanti più organismi “indesiderati” in maniera che essi non interferiscano con l'organismo da isolare.

## **Principi di microbiologia selettiva e differenziale**

Sfruttando alcune caratteristiche morfologiche e fisiologiche particolari dell'organismo da isolare è possibile:

- formulare substrati nutritivi (liquidi e solidi) che migliorano la sua crescita;
- selezionare condizioni di incubazione ad esso favorevoli (temperatura, atmosfera, tempo);
- decidere se sottoporre il campione a pretrattamenti che facilitino il suo isolamento selettivo (ad esempio trattando termicamente il campione per isolare solo le forme sporigene).

**Quando l'arricchimento è formulato in maniera da inibire lo sviluppo di microrganismi competitori si parla di arricchimento selettivo.**

In genere i brodi di arricchimento hanno una composizione molto simile ai substrati solidi usati per il successivo isolamento selettivo.

I selettivi usati sono, in genere, antibiotici, coloranti (come verde brillante, cristalvioletto eec.) e tensioattivi (ad esempio i sali biliari) a cui il microrganismo da isolare è resistente.

E' possibile formulare anche substrati nutritivi agarizzati, contenenti sostanze selettive (substrati selettivi solidi) che favoriscono lo sviluppo di un gruppo di microrganismi ostacolandone quello di altri.

In genere, ai substrati selettivi solidi, vengono aggiunte particolari sostanze chimiche che portano ad una modificazione del substrato come conseguenza di una particolare attività metabolica del microrganismo da isolare. Tali substrati sono detti differenziali in quanto consentono di differenziare il microrganismo da isolare da altri che pur crescendo sullo stesso substrato selettivo non presentano quella particolare attività metabolica.

La maggior parte dei substrati differenziali sfruttano la capacità del microrganismo di fermentare un particolare carboidrato (variazioni di pH) o di produrre particolari metaboliti che rendono "caratteristica" la colonia da isolare.

## Fasi per la ricerca di specifici patogeni negli alimenti

### **Resuscitazione o prearricchimento non selettivo**

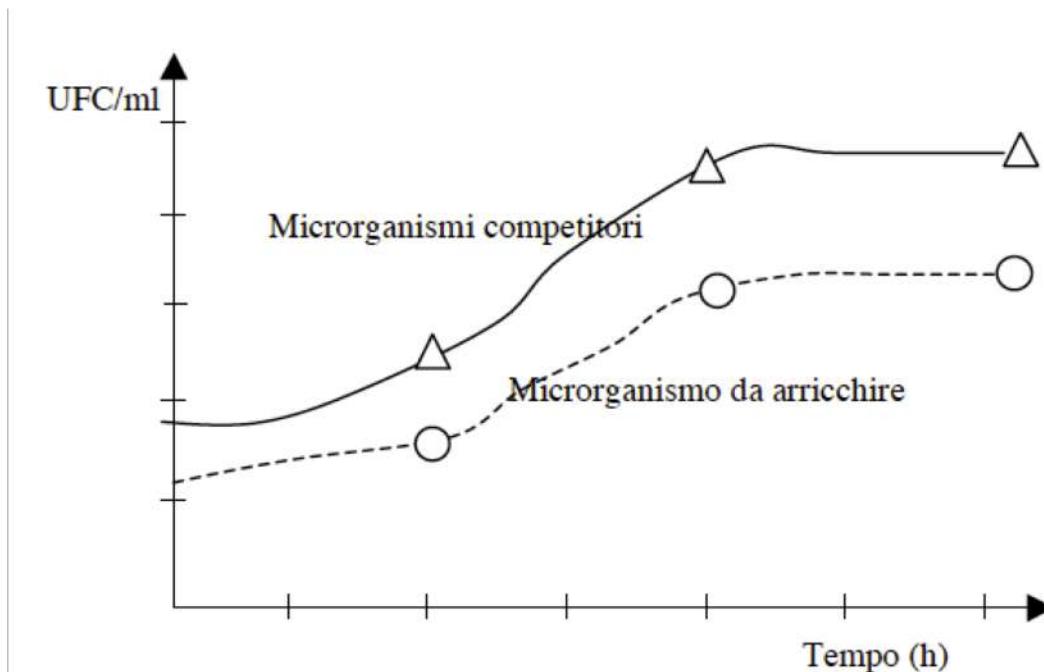
In alimenti processati (trattamenti termici, essiccazione, irradiazione, refrigerazione, congelamento, ecc.) le cellule microbiche presenti possono subire danneggiamenti come conseguenza del trattamento, che pur non uccidendole, non consente loro di moltiplicarsi; in questo caso si parla di cellule danneggiate subletalmente.

Il danno cellulare può essere riparato dal microrganismo anche nello stesso alimento processato se le condizioni nutritive e di conservazione dell'alimento sono tali da favorire la sua moltiplicazione. Questa condizione può avere importanti implicazioni nell'analisi microbiologica di un alimento. Infatti i risultati analitici potranno essere non attendibili con una sottostima del numero di patogeni, o addirittura condurre a falsi negativi, come conseguenza del mancato rilevamento del microrganismo danneggiato.

Queste situazioni si superano **se l'analisi microbiologica di alimenti fortemente processati viene fatta precedere da una fase di resuscitazione o prearricchimento** in un substrato o in condizioni culturali che consentono la riparazione delle cellule danneggiate. Nell'analisi qualitativa, per recuperare cellule danneggiate subletalmente, si omogeneizza il campione in un substrato liquido nutrizionalmente completo e complesso, che dopo incubazione per tempi e temperature ottimali per il microrganismo, viene trasferito in un substrato liquido selettivo.

## Resuscitazione o prearricchimento non selettivo

Nei casi in cui è richiesta la determinazione del numero di un particolare microrganismo in un alimento in cui si presume la presenza di cellule danneggiate subletalmente, la fase di resuscitazione viene in genere applicata nel modo seguente: si seminano aliquote di diluizioni del campione su un adatto substrato solido nutrizionalmente completo e non selettivo, quindi, le piastre sono incubate per tempi sufficienti a recuperare le cellule danneggiate (in genere 3 ore) senza però dare il tempo alle cellule di moltiplicarsi. Infatti, se tale tempo fosse troppo lungo, si avrebbe una crescita di altri microrganismi contaminanti l'alimento, rendendo difficile l'isolamento del microrganismo ricercato nella fase successiva dell'analisi.

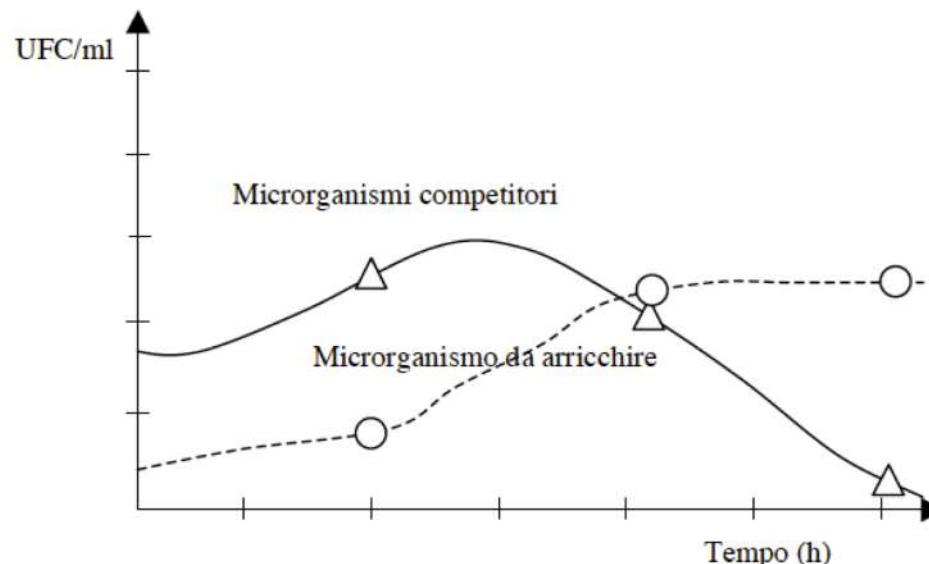


# Arricchimento selettivo

L'obiettivo dell'arricchimento selettivo per la ricerca di uno specifico patogeno negli alimenti è quello di favorire il più possibile il suo sviluppo rispetto alla microflora che lo accompagna, che non essendo di nessun interesse per l'analisi, si cerca di inibire il più possibile.

L'arricchimento selettivo è una fase obbligatoria quando si ricercano i microrganismi patogeni, in quanto i criteri microbiologici per questi microrganismi prevedono la loro assenza in almeno 25 g di alimento.

Questo implica che il metodo di analisi deve essere in grado di rilevare anche una sola cellula del microrganismo in presenza di altri contaminanti. Ciò equivale a dire che l'arricchimento selettivo deve assicurare che in un'ansata (pochi  $\mu\text{l}$ ) del substrato prelevata al termine della fase di incubazione contenga almeno 1 UFC del microrganismo



## Isolamento su substrato selettivo e differenziale

Quando si parla di isolamento selettivo si fa riferimento allo striscio di aliquote di un brodo di arricchimento di un campione su substrati agarizzati selettivi e differenziali. L'obiettivo di questa fase è quella di ottenere colonie isolate del patogeno che potranno essere utilizzate nelle fasi successive dell'analisi.

Specifici microrganismi danno origine a colonie tipiche su appropriati substrati selettivi e differenziali.

Tuttavia, la selettività e la differenzialità di tali substrati non è assoluta. Infatti, è possibile che nell'ambito di popolazioni normalmente sensibili agli agenti selettivi utilizzati nel substrato per isolare un dato patogeno, esistano specie o ceppi particolarmente resistenti; inoltre, molto spesso, le caratteristiche metaboliche utilizzate per differenziare il batterio ricercato, sono possedute in ugual misura da altri microrganismi, anche non strettamente correlati tassonomicamente ad esso.

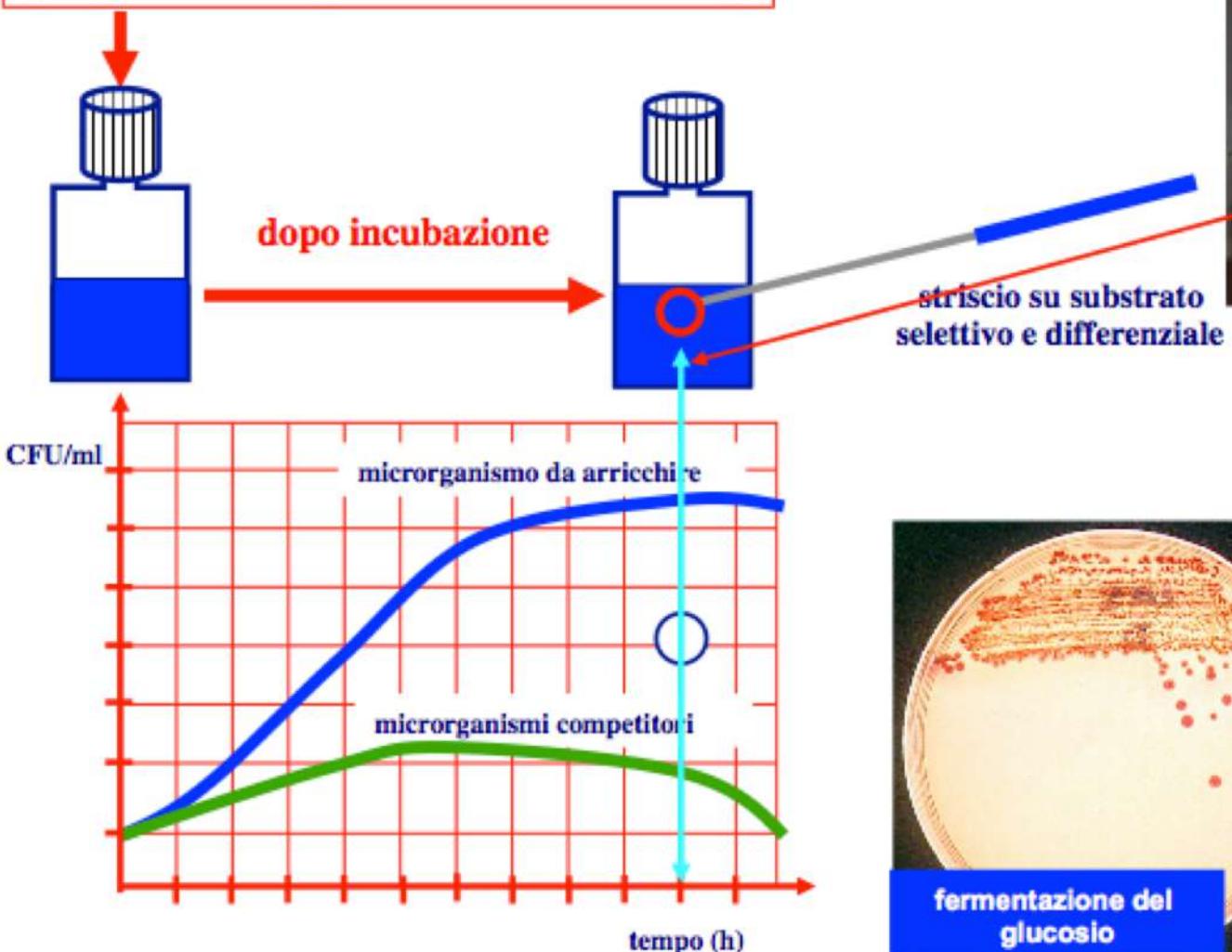
## **Conferma dell'isolato**

### osservazione microscopica

- ◆ reazione di Gram (gram positivo o gram negativo);
- ◆ saggio della catalasi (idrolisi dell'acqua ossigenata);
- ◆ saggio dell'ossidasi;
- ◆ accertamento della mobilità in substrato semi-molle;

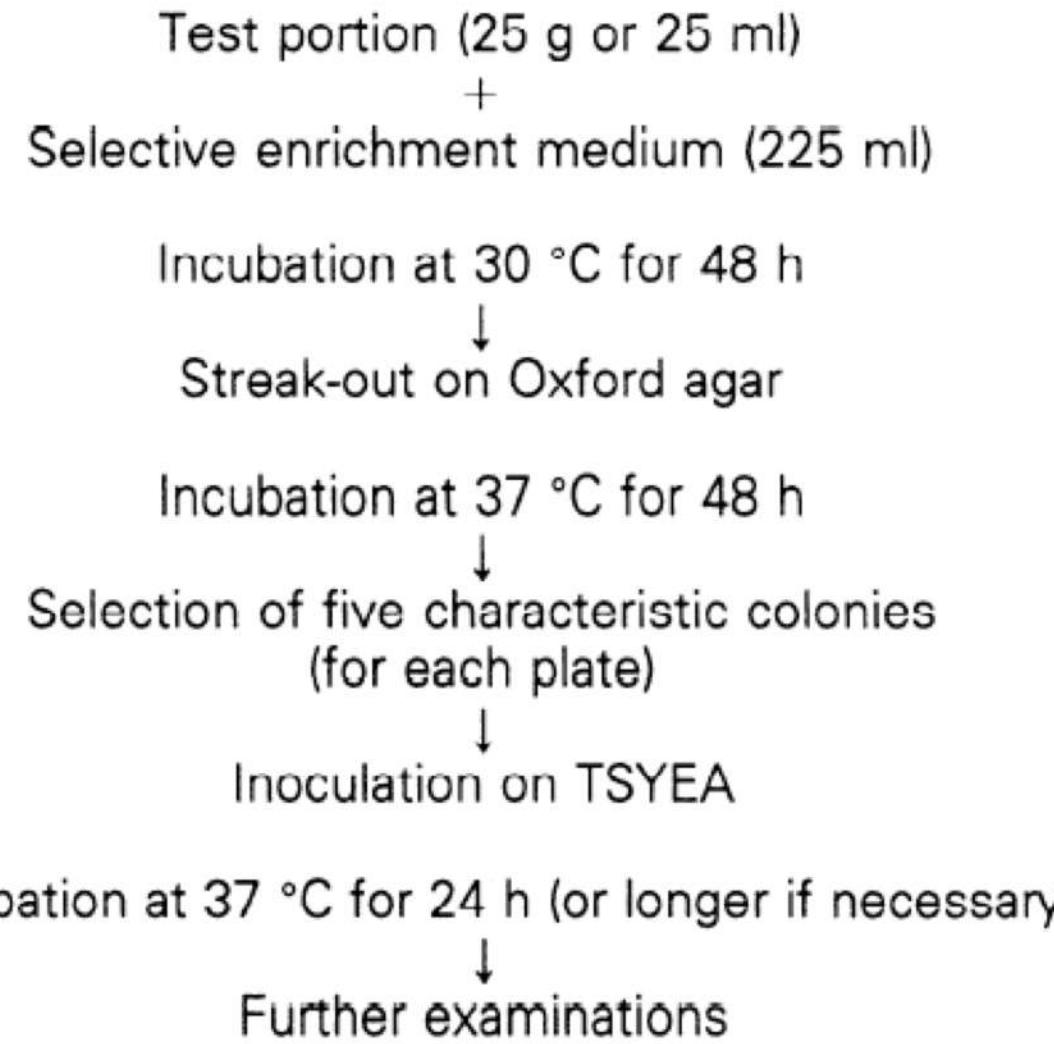
# ARRICCHIMENTO IN BRODO SELETTIVO E ISOLAMENTO SELETTIVO E DIFFERENZIALE

sospensione del campione 1/10  
(in genere 25 g in 225 ml di brodo)



# Ricerca di *Listeria monocytogenes* nel latte e derivati del latte

<b>Arricchimento selettivo primario</b>	In un sacchetto sterile aggiungere 25 g o 25 ml di campione e 225 ml Listeria Enrichment Broth. Omogeneizzare per 1-2 min in Stomacher.
<b>Temperatura (°C) e tempo (h) di incubazione</b>	Incubare per 24+24 ore e fino a 7 giorni a 30° C.
<b>Arricchimento selettivo secondario</b>	Trasferire 0,1 ml del brodo di arricchimento in 10 ml di Listeria Enrichment Broth.
<b>Temperatura (°C) e tempo (h) di incubazione</b>	Incubare a 35-37°C per 48 ore.
<b>Isolamento su terreno selettivo e differenziale</b>	Strisciare con ansate di ciascun brodo di arricchimento (primario e secondario) una piastra di Oxford agar; può essere usato anche i Palcam agar.
<b>Temperatura (°C) e tempo (h) di incubazione</b>	Incubare le piastre a 37° C per 24+24 ore.
<b>Selezione di colonie tipiche e loro isolamento in coltura pura</b>	Anotare la comparsa di colonie sospette (tipiche) che presentino le seguenti caratteristiche: <ul style="list-style-type: none"> <li>- su Oxford agar: piccole (1 mm di diametro) grigioastre circondate da un alone nero dovuto all'idrolisi dell'esculina. Dopo 48, le colonie, tendono a diventare più scure e più grandi leggermente infossate nel terreno con centro concavo.</li> <li>- su Palcam agar: piccole, grigio-verde o grigio-oliva con alone nero e talvolta con il centro nero su sfondo rosso del substrato.</li> </ul> Prelevare almeno 3-5 colonie tipiche e strisciare su piastre contenenti un terreno nutritivo non selettivo (ad esempio TSA con aggiunto lo 0,6% di estratto di lievito). Incubare le piastre a 35-37° C per 24 ore.
<b>Identificazione (Conferma dell'isolato)</b>	Accertata la purezza delle colonie trapiantate, gli isolati presuntivi devono essere identificati come appartenenti al genere <i>Listeria</i> attraverso i seguenti test:  <i>Morfologia delle cellule</i> : L'osservazione microscopica deve rilevare la presenza di bastoncini. <i>Gram-reazione</i> : l'osservazione microscopica deve rilevare la presenza di bastoncini Gram positivi (colorati in violetto). <i>Catalasi</i> : il test deve rilevare lo sviluppo di efferveszenza (sviluppo di gas) che indicherà la presenza dell'enzima. <i>Mobilità</i> : inoculare per infissione una provetta contenente il terreno Motility medium, con un'ansata della coltura del ceppo cresciuto per 24 ore in TSB a 20-25°C, ed incubare a 25°C per 48 ore. I batteri mobili cresceranno anche intorno alla linea di infissione (tipica crescita "a ombrello"). <i>Emolisi su agar sangue</i> : inoculare per infissione più punti di una piastra contenente Agar sangue. Dopo incubazione a 37°C <i>Listeria monocytogenes</i> presenta zone di beta emolisi molto strette. <i>Prove biochimiche</i> (vedi tabella 6.10). <i>Impiego di sistemi di identificazione multitest specifici per <i>Listeria</i>.</i>
<b>Conferma sierologica</b>	agglutinazione su vetrino con antisieri O.



**Figure 1 — Diagram of procedure**

<b>Caratteri</b>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>
β-emolisi	+	+	+	-	-
CAMP test:					
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-
Produzione acido da:					
esculina	+	+	+	+	+
maltosio	+	+	+	+	+
mannitolo	-	-	-	-	-
xilosio	-	+	+	-	+
ramnosio	+	-	-	v	v
α-metil-D-mannoside	+	-	-	+	+
Virulenza nel topo	+	+	-	-	-

