

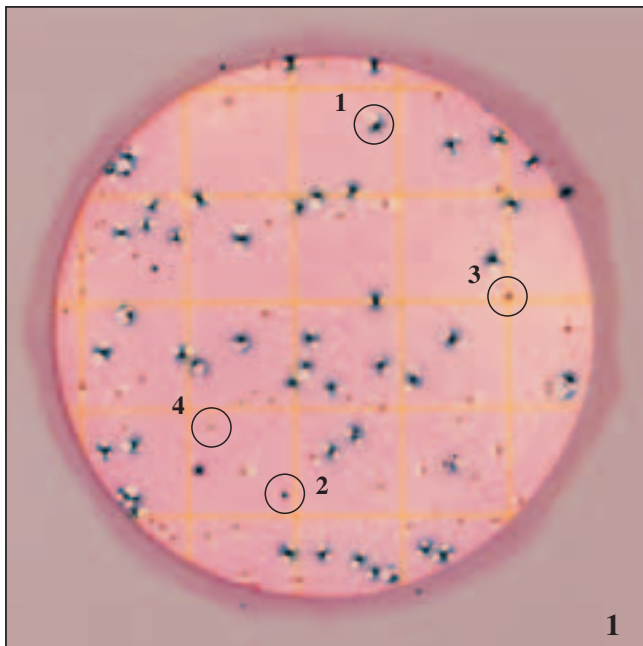


Petrifilm™

Piastre per il conteggio dei Coliformi e di *E. coli*

La presente guida serve per familiarizzare con i risultati delle piastre per il conteggio dei Coliformi e di *E. coli* (EC) 3M™ Petrifilm™. Per maggiori informazioni, contattare il rappresentante ufficiale di zona di 3M Prodotti per Microbiologia.

Le piastre Petrifilm EC contengono nutrienti VRB, un agente gelificante solubile in acqua fredda, un indicatore dell'attività della glucuronidasi BCIG e un indicatore di colore (tetrazolio) che facilita il conteggio delle colonie. Il film superiore trattiene il gas prodotto dai Coliformi e da *E. coli*.



- *Il tempo, la temperatura di incubazione e l'interpretazione delle piastre Petrifilm EC variano a seconda dei metodi. Di conseguenza, i risultati possono essere leggermente diversi. Le temperature di incubazione usate nei metodi più comuni sono indicate nella documentazione allegata al prodotto e alcuni esempi vengono forniti nella sezione tecnica (pagine 2 e 3) della presente Guida.*

- *Non contare le colonie cresciute sulla schiuma che delimita l'area circolare in quanto in questa zona possono perdere l'influenza selettiva del terreno.*

- Seguire il tempo e la temperatura abitualmente usati in laboratorio. Le temperature usate più comunemente sono le seguenti: 35, 37, 42 o 44° C per 24-48 ore.

E. coli :

E. coli può crescere in terreni contenenti sostanze nutritive Violet Red Bile (VRB). La maggior parte di *E. coli* (circa il 97%) produce beta-glucuronidasi che reagisce con un indicatore di colore BCIG nella piastra Petrifilm EC che fa diventare rossa o rosso-blu la colonia. Circa il 95% di *E. coli* produce gas dal lattosio: ciò è indicato dalle colonie associate a bolla di gas (entro il diametro di una colonia circa). Vedere cerchio 1. Le colonie di *E. coli* sono

blu e rosso-blu e producono gas. Confermare le colonie blu e rosso-blu senza gas. Vedere cerchio 2. In alcuni processi di convalida, questa interpretazione è stata modificata: gli enti AOAC, NMKL, EMMAS hanno convalidato o accertato l'uso della piastra per il conteggio di *E. coli* e dei Coliformi in condizioni specifiche. Vedere pagina 2 e 3 della presente guida.

Nota :

La maggior parte dei ceppi di *E. coli* O157:H7 sono atipici : non crescono a temperature $\geq 44.5^\circ$ C, sono glucuronidasi-negativi e quindi non producono un precipitato blu. Compariranno, quindi, come Coliformi non-*E. coli* (rossi con gas).

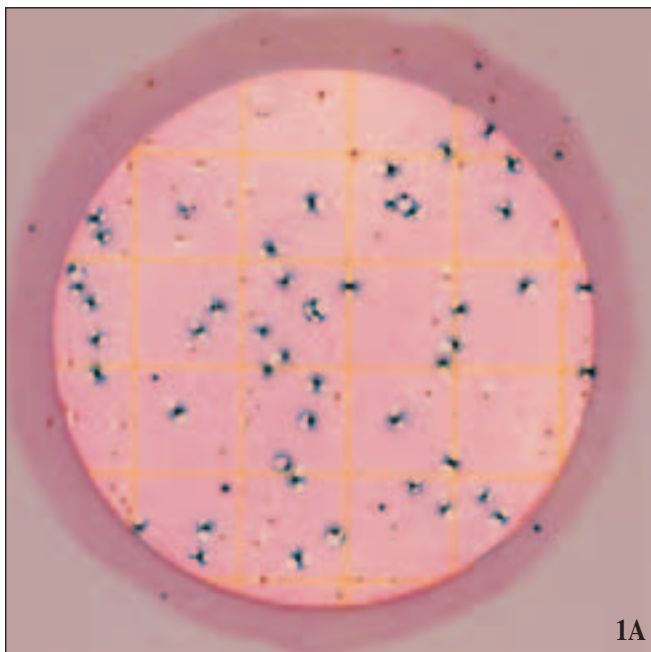
Coliformi :

La piastra per il conteggio di *E. coli* e dei Coliformi può anche essere usata per cercare i Coliformi.

- **L'ISO** definisce i Coliformi per la loro capacità di crescere in mezzi selettivi secondo metodi specifici. **Il metodo ISO 4832**, enumerazione dei Coliformi con la tecnica del conteggio delle colonie, definisce i Coliformi per le dimensioni della colonia e la produzione di acido su VRB agar con lattosio (VRBL) . Sulle piastre Petrifilm EC, questi Coliformi che producono acido sono indicati da colonie rosse con o senza gas (entro il diametro di una colonia circa). Vedere cerchio 3. **Il metodo ISO 4831**, enumerazione dei Coliformi con il metodo del numero più probabile (Most Probable Number - MPN), definisce i Coliformi per la loro capacità di crescere e produrre gas dal lattosio in un brodo selettivo. Sulle piastre Petrifilm EC questi Coliformi sono indicati da colonie rosse associate a gas (entro il diametro di una colonia circa). Vedere cerchio 4.

- **AOAC INTERNATIONAL** e U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) definiscono i Coliformi come microrganismi gram-negativi che producono acido e gas dal lattosio durante la fermentazione metabolica. Le colonie di Coliformi che crescono sulla piastra Petrifilm EC producono acido che scurisce il gel. Il gas intrappolato intorno alle colonie di Coliformi (entro il diametro di una colonia circa) indica i Coliformi confermati. Vedere cerchio 4.

Interpretazione delle Piastre Petrifilm EC



53 *E. coli*.

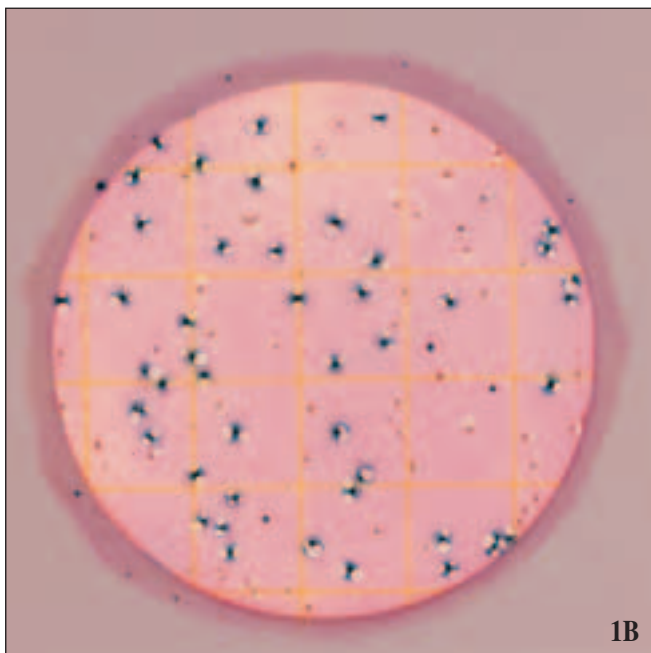
Metodo raccomandato in Francia

Incubazione:

24h +/- 2h a 42 °C +/- 1°C

Interpretazione:

- *E. coli* : Contare tutte le colonie blu con e senza gas.



47 *E. coli*, metodo ufficiale AOAC.

87 Coliformi confermati, metodo ufficiale AOAC.

Leggere il seguente AOAC International, tutti gli alimenti (metodo 991.14)

Incubazione:

- Coliformi in tutti gli alimenti : incubare 24h +/- 2h a 35°C +/- 1°C.
- Conteggio di *E. coli* in tutti gli alimenti , tranne quelli indicati di seguito: incubare 48h +/- 2h a 35°C +/- 1°C.

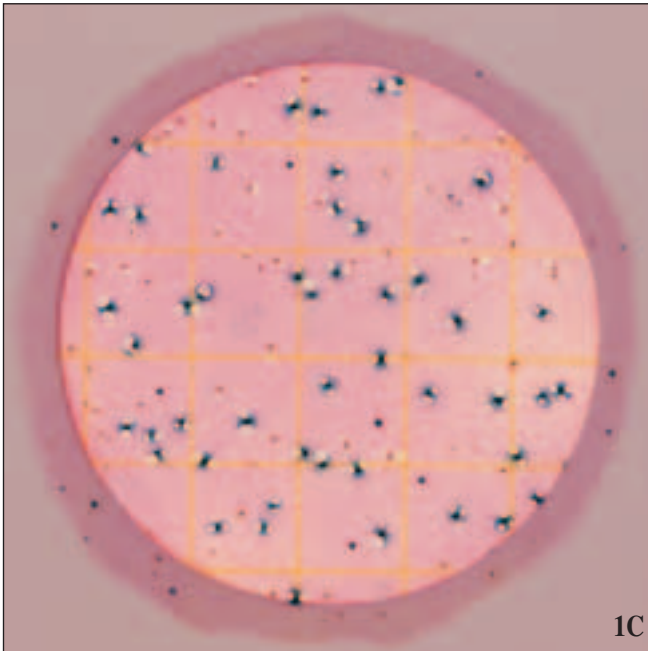
Leggere il seguente AOAC International, carne, pollame e pesce (metodo 998.08)

Incubazione:

- Conteggio di *E. coli* nella carne, nel pollame e nei frutti di mare e dei Coliformi in tutti gli alimenti : incubare 24h +/- 2h a 35°C +/- 1°C.

Interpretazione (Metodi 991.14 e 998.08)

- *E. coli* : colonie blu con gas.
- Coliformi confermati: tutte le colonie con gas (blu e rosse).



53 *E. coli*, metodo NMKL.

95 Coliformi totali, metodo NMKL.

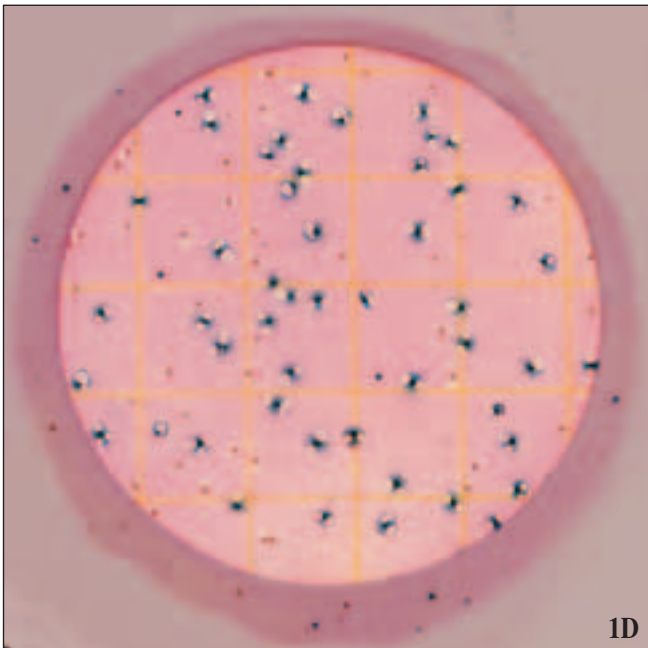
Leggere il seguente NMKL (metodo 147.1993)

Incubazione:

37°C +/- 1°C

Interpretazione:

- *E. coli*: contare tutte le colonie blu, con e senza gas dopo 48h +/- 2h di incubazione.
- Coliformi : Contare le colonie rosse con produzione di gas e tutte le colonie blu, con o senza produzione di gas, dopo 24h +/- 2h di incubazione.



53 *E. coli*, metodo accertato EMMAS.

Leggere il seguente metodo validato EMMAS

Incubazione:

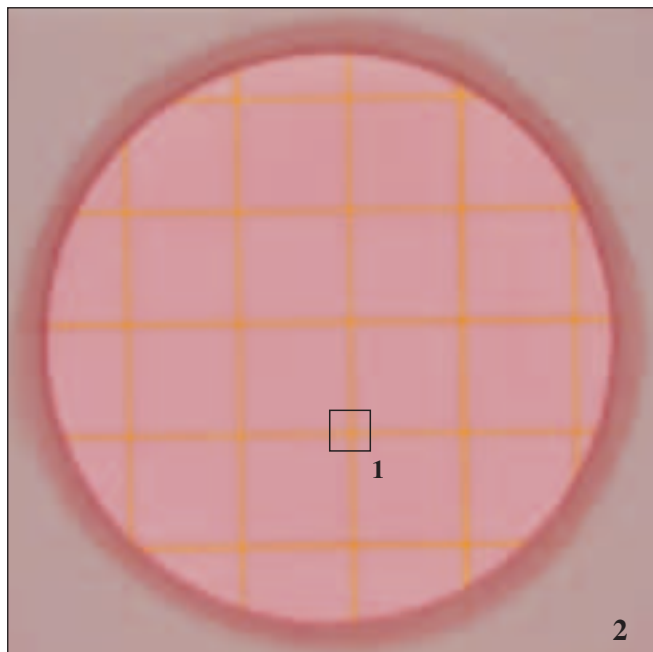
48h +/- 2h a 37°C +/- 1°C

Interpretazione:

- *E. coli* : contare tutte le colonie blu con e senza gas.
Si consiglia di confermare le colonie blu senza gas, in particolare quando sono presenti in percentuale elevata.

Piastra 3M Petrifilm per il conteggio di *E. coli* e dei Coliformi

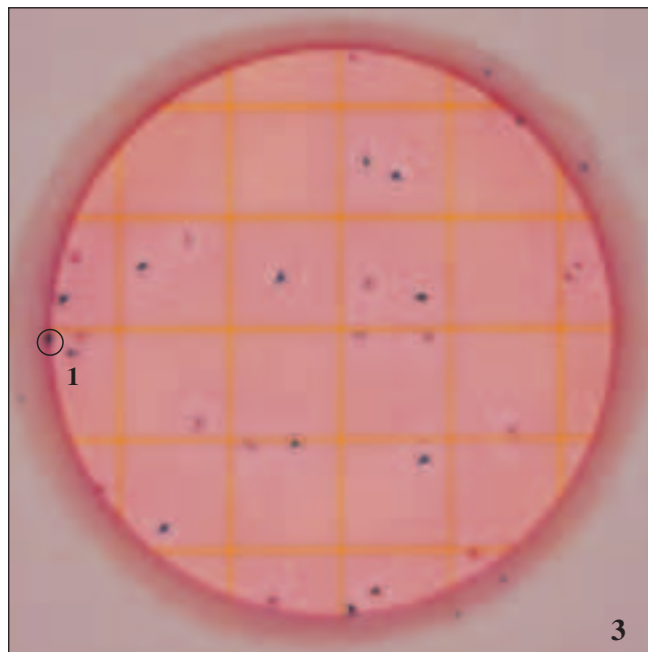
Si noti il cambiamento di colore del gel nella sequenza dalla figura 2 alla figura 8. Man mano che il conteggio di *E. coli* o dei Coliformi aumenta, il gel diventa rosso scuro o violaceo.



Nessuna crescita

Conteggio di *E. coli* = 0

Le bolle di fondo sono una caratteristica del gel e non il risultato della crescita di *E. coli* o di Coliformi. Le bolle di gas di fondo sono molto piccole, di forma regolare e non hanno una colonia associata. Vedere quadrato 1.



Conteggio di *E. coli* = 13

Conteggio di Coliformi che producono gas = 28

Come per le piastre in agar VRB, anche nelle piastre Petrifilm EC il range ideale di conteggio (popolazione totale delle colonie in piastra) è di 15 - 150.

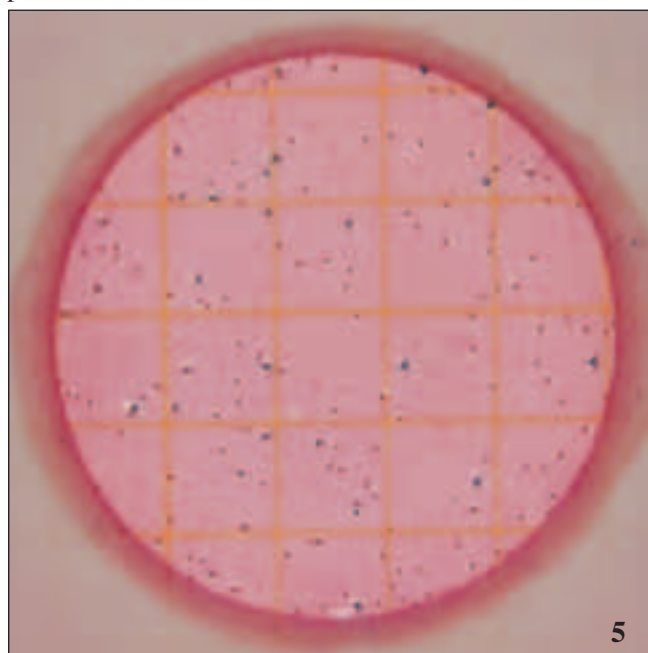
Non contare le colonie che compaiono sulla schiuma che delimita l'area circolare perché in questa zona possono perdere l'influenza selettiva del terreno. Vedere cerchio 1.



Conteggio di *E. coli* = 3

Anche una leggera colorazione blu in una colonia (da blu a rosso-blu) indica la presenza di *E. coli*. Una illuminazione frontale può migliorare l'individuazione del precipitato blu formato da una colonia.

- Il cerchio 1 mostra una colonia rosso-blu evidenziata da illuminazione posteriore.
- Il cerchio 2 mostra la stessa colonia con una illuminazione frontale. Il precipitato blu è più evidente in questo caso.



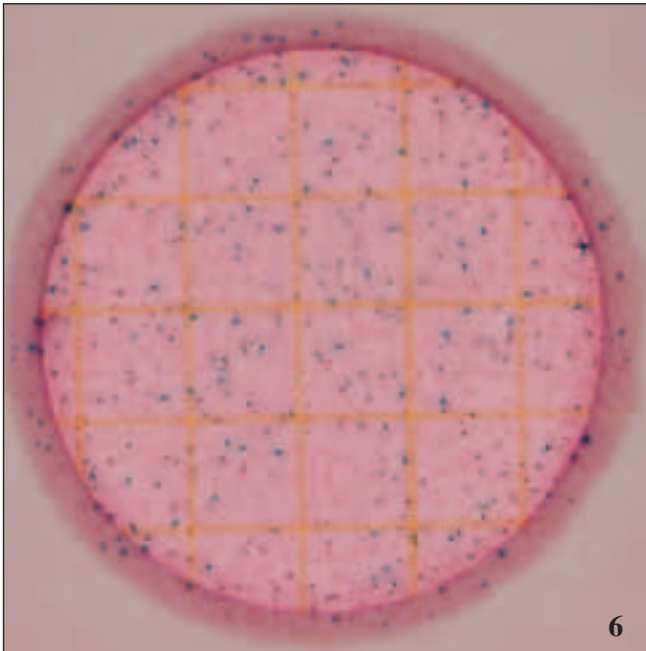
Conteggio di *E. coli* = 20

Conteggio totale stimato = 150

L'area di crescita circolare sulla piastra Petrifilm EC è di circa 20 cm². Si possono fare stime sulle piastre contenenti più di 150 colonie contando il numero di colonie in uno o più quadrati rappresentativi e determinare il numero medio per quadrato. Per determinare il conteggio stimato per ogni piastra Petrifilm EC, moltiplicare il numero medio per 20.

Interpretazione di piastre con numero di colonie molto elevato (superiore al range di lettura consigliato)

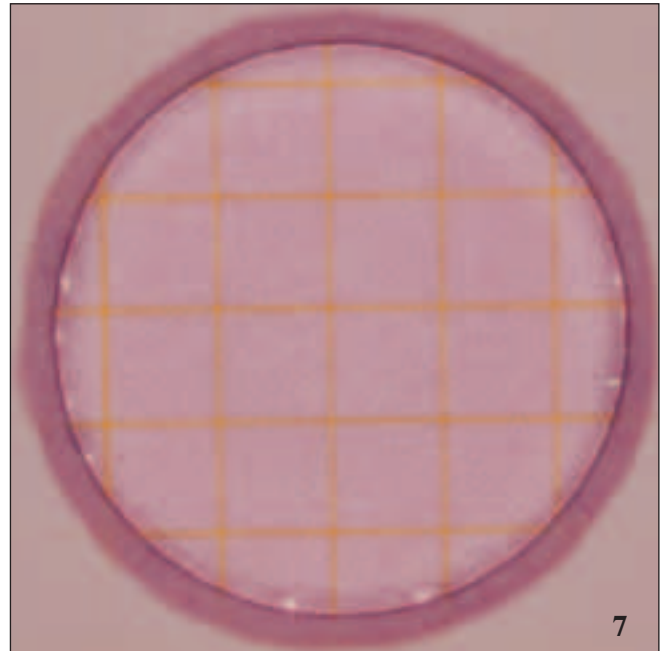
Per ottenere un conteggio accurato, diluire ulteriormente il campione



6

Conteggio reale ~ 10^6

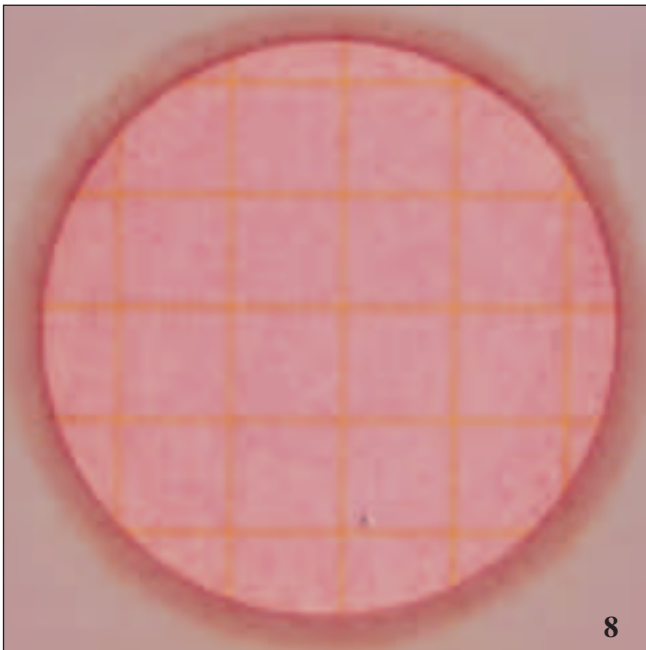
Le piastre Petrifilm EC con un numero molto elevato di colonie hanno una o più delle seguenti caratteristiche: numerose piccole colonie, molte bolle di gas e un gel più scuro, da rosso a violaceo.



7

Conteggio reale ~ $10^{8.8}$

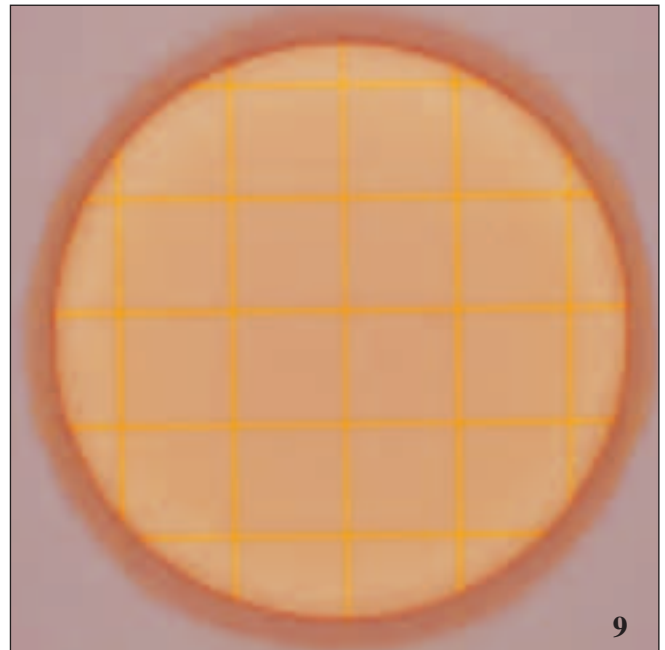
Le concentrazioni elevate di *E. coli* rendono il terreno di crescita violaceo.



8

Conteggio reale ~ 10^8

Le concentrazioni elevate di Coliformi (non *E. coli*) rendono il terreno di crescita rosso scuro. Per stabilire se *E. coli* è presente sono necessarie diluizioni supplementari.

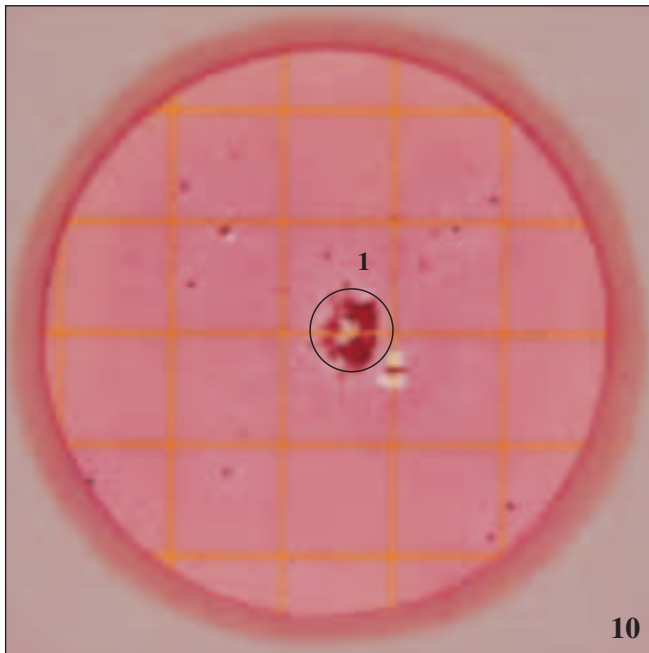


9

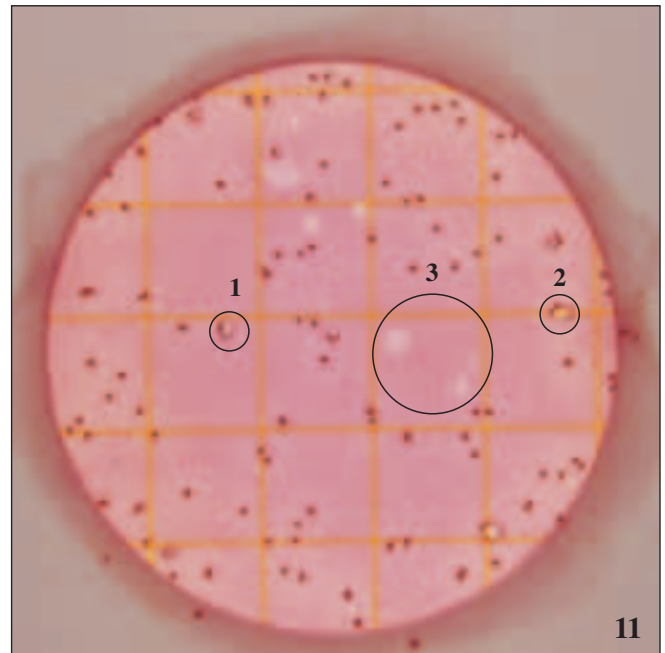
Conteggio reale ~ 10^8

Quando un numero elevato di organismi non-Coliformi, come *Pseudomonas*, è presente sulle piastre Petrifilm EC, il gel può diventare giallo.

Bolle



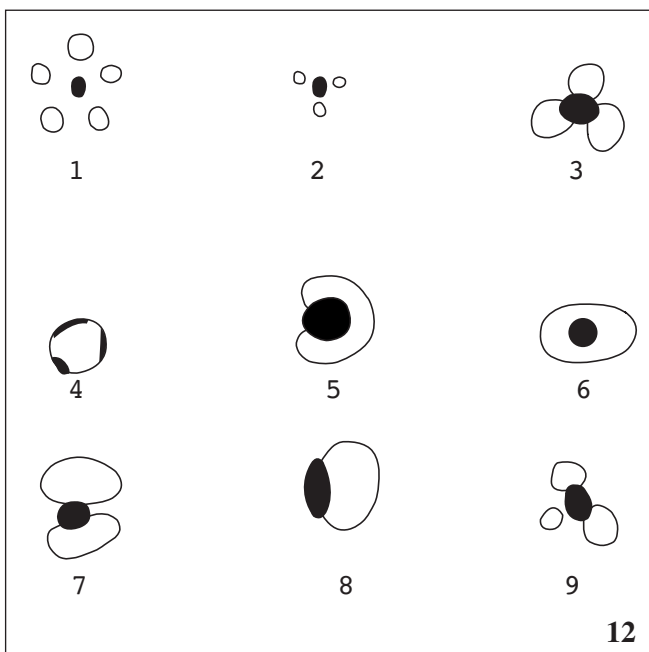
Pezzetti di prodotto alimentare eventualmente presenti hanno una forma irregolare e non sono associati a bolle di gas. Vedere figura 10.



La figura 11 mostra come possono variare le forme delle bolle. Talvolta il gas rompe la colonia cosicché la colonia "delinea" la bolla. Vedere cerchi 1 e 2.

Le bolle artefatte possono essere dovute ad un inoculo non corretto della piastra Petrifilm EC o ad aria intrappolata nel campione. Hanno forma irregolare e non sono associate ad una colonia. Vedere cerchio 3.

Non contare le colonie presenti sulla schiuma che delimita l'area circolare perché in questa zona possono perdere l'influenza selettiva del terreno.



Alcuni esempi aggiuntivi di diverse forme di bolle associate ad una colonia. E' necessario prenderle tutte in considerazione.

3M™ Petrifilm™

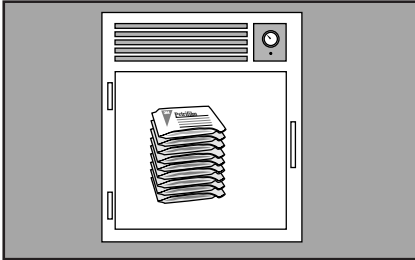
Piastre per il conteggio di E. coli e dei Coliformi

Per le Avvertenze, le Precauzioni, la Garanzia, i Rimedi Limitati, lo Stoccaggio e lo Smaltimento e le Istruzioni per l'uso, vedere le note informative all'interno della confezione.

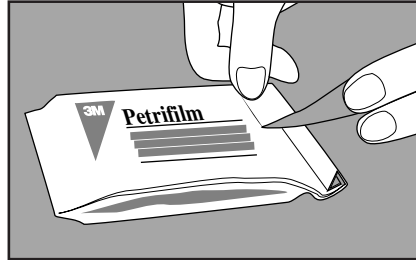
Guida
all'utilizzo



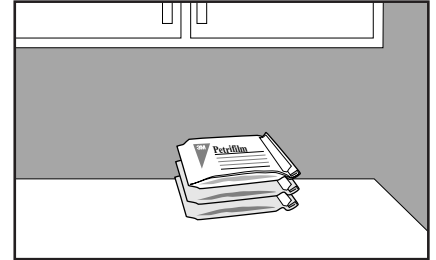
Stoccaggio



1 **Conservare** le confezioni chiuse ad una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$. Utilizzare le piastre entro la data di scadenza indicata sulla confezione.



2 Per sigillare le confezioni aperte, ripiegare l'apertura e sigillarla con nastro adesivo.

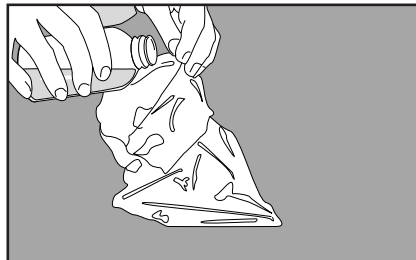


3 Conservare le confezioni così richiuse a $\leq 25^{\circ}\text{C}$ e $\leq 50\%$ RH. **Non conservare in frigorifero le confezioni aperte.** Usare le piastre Petrifilm entro un mese dall'apertura.

Preparazione



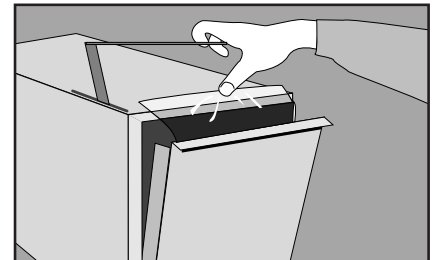
4 Pesare o pipettare il campione di prodotto da analizzare in un contenitore sterile adeguato come un sacchetto da stomacher, un flacone per diluizioni, un sacchetto Whirl-Pak® o altri contenitori sterili appositi.



5 Aggiungere la quantità appropriata di uno dei seguenti diluenti sterili: tampone fosfato Butterfield's (KH_2PO_4 a $0,0425\text{g/L}$, correggere il pH a 7,2), 0,1% acqua peptonata, diluente al sale peptonato (metodo ISO 6887), soluzione salina (0,85 - 0,90%) o acqua distillata.

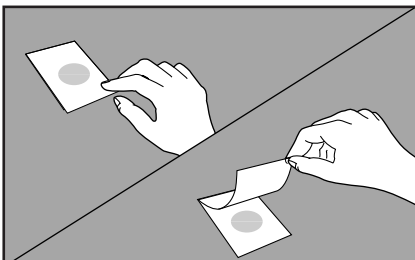
Non usare tamponi contenenti citrato, bisolfito o tiosolfato.
Regolare il pH del campione diluito tra 6,6 e 7,2:

- per i prodotti acidi, usare NaOH 1N,
- per i prodotti alcalini, usare HCl 1N.

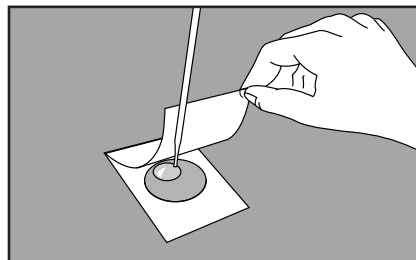


6 Miscelare o omogeneizzare il campione secondo le procedure correnti.

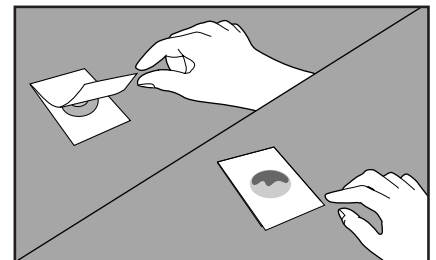
Inoculo



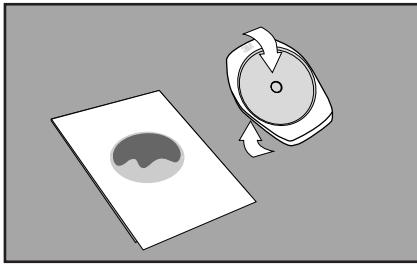
7 Posizionare la piastra Petrifilm su una superficie **piana**. Sollevare il film superiore.



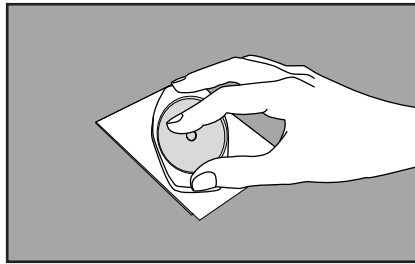
8 Tenendo una pipetta **perpendicolare** alla piastra Petrifilm, seminare 1 mL di campione nella parte centrale del film basale.



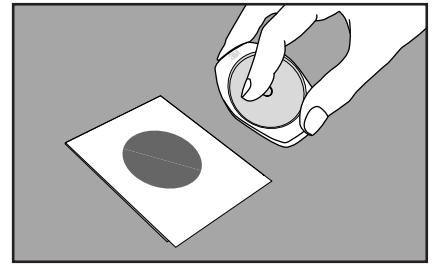
9 **Arrotolare attentamente** il film superiore per evitare di intrappolare bolle d'aria. **Non** lasciar cadere il film di copertura.



10 Posizionare il diffusore in plastica, tenendo il lato piatto rivolto verso il basso, sul film di superiore sopra il campione seminato.

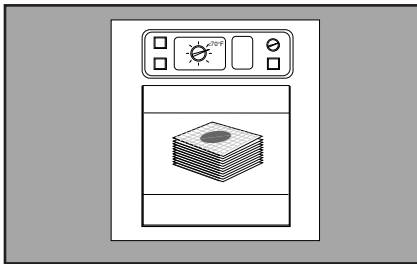


11 Esercitare una **leggera** pressione sul diffusore per distribuire il campione lungo l'area circolare. Non torcere o far scivolare il diffusore.



12 Sollevare il diffusore. Attendere almeno un minuto perché il gel solidifichi.

Incubazione

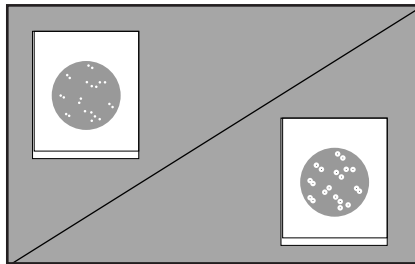


13 Incubare le piastre con il lato trasparente verso l'alto, in pile massime di 20 piastre. Il tempo e la temperatura di incubazione variano a seconda del metodo*. I metodi approvati più comunemente utilizzati sono:

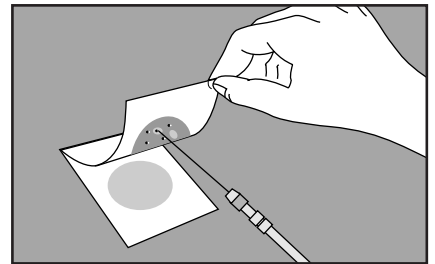
- Metodo ufficiale AOAC 991.14: per i Coliformi, incubare 24h ± 2h a 35°C ± 1°C; per E. coli, incubare 48h ± 2h a 35°C ± 1°C.
- Metodo ufficiale AOAC 998.08 conteggio di E. coli nella Carne, Pollame e Pesce, e dei Coliformi in tutti gli alimenti, incubare per 24h +/- 2h a 35°C +/- 1°C
- Metodo NMKL 147.1993: per i Coliformi, incubare 24h ± 2h a 37°C ± 1°C; per E. coli, incubare 48h ± 2h a 37°C ± 1°C.

*Vedere le note informative all'interno della confezione.

Interpretazione



14 Il conteggio con le piastre Petrifilm può essere effettuato con un conta-colonie standard o con qualsiasi altro ingranditore. Per la lettura dei risultati, consultare la sezione Guida all'interpretazione.



15 Le colonie possono essere isolate per una identificazione successiva. Sollevare il film superiore e prelevare la colonia dal gel.

Commenti aggiuntivi

- **Non dimenticare di inoculare e distribuire il campione su ogni piastra Petrifilm prima di continuare con la piastra successiva.**
- **Il tempo e la temperatura di incubazione variano a seconda del metodo, vedi documentazione allegata al prodotto.**

Riferimenti del documento

Data	Revisione
Marzo 2002	1.0

3M

Prodotti per Microbiologia
3M Italia Spa

Via San Bovio, 1/3
20090 Segrate - MI
Tel : 02 70353457
Fax : 02 70353210



3M e Petrifilm sono marchi registrati della 3M Company.
Whirl-Pak è un marchio registrato della Nasco