



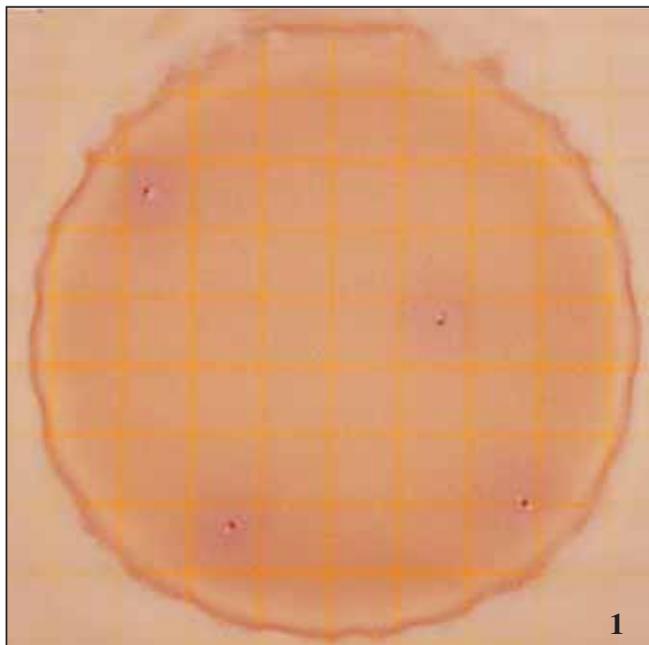
Petrifilm™

Piastre per il conteggio dei Coliformi ad alta sensibilità

La presente guida serve per familiarizzare con i risultati delle piastre 3M™ Petrifilm™ per il conteggio dei Coliformi ad alta sensibilità (HSCC). Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante ufficiale di zona di 3M Prodotti per Microbiologia.

Le piastre Petrifilm HSCC contengono un terreno di coltura selettivo VRB pronto all'uso, un agente gelificante solubile in acqua fredda, un indicatore di colore (tetrazolio) che facilita il conteggio delle colonie. Il film superiore trattiene il gas prodotto dai coliformi che fermentano il lattosio. Tempi e temperature di incubazione variano secondo il metodo di riferimento scelto.

- **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 HSCC, questi coliformi che producono acido sono indicati da colonie rosse senza gas o con gas (entro una distanza pari ad approssimativamente il diametro di una colonia). 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 HSCC questi coliformi sono indicati da colonie rosse associate a gas (entro una distanza pari ad approssimativamente il diametro di una colonia).
- **AOAC INTERNATIONAL** e la Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (BAM) definiscono i coliformi come microrganismi gram-negativi che producono acido e gas dal lattosio durante la fermentazione metabolica. Le colonie coliformi che crescono sulle piastre Petrifilm HSCC producono acido, che provoca una colorazione scura del gel; il gas intrappolato attorno alle colonie rosse (entro una distanza pari ad approssimativamente il diametro di una colonia) indica che le colonie sono coliformi.



Numero di colonie che producono gas : 4

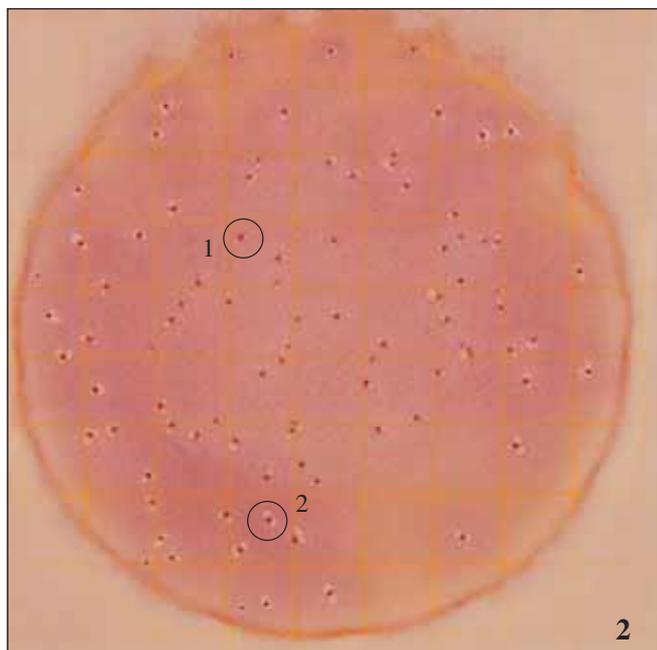
Le piastre Petrifilm HSCC possono essere utilizzate per il conteggio sia di coliformi totali sia di coliformi termotolleranti (fecali).

Le piastre Petrifilm HSCC sono raccomandate per il conteggio di bassi numeri di coliformi in tutti gli alimenti.

AFNOR ha validato l'uso delle piastre Petrifilm HSCC in condizioni specifiche. Fare riferimento alla sezione Guida all'Utilizzo della presente Guida all'interpretazione.

Piastra 3M™ Petrifilm™ ad alta sensibilità per il conteggio dei coliformi

Osservare il cambiamento di colore nelle figure da 1 a 5. Man mano che il numero di colonie e la produzione acida aumentano, il colore del gel da arancio chiaro diventa rosa-rosso.



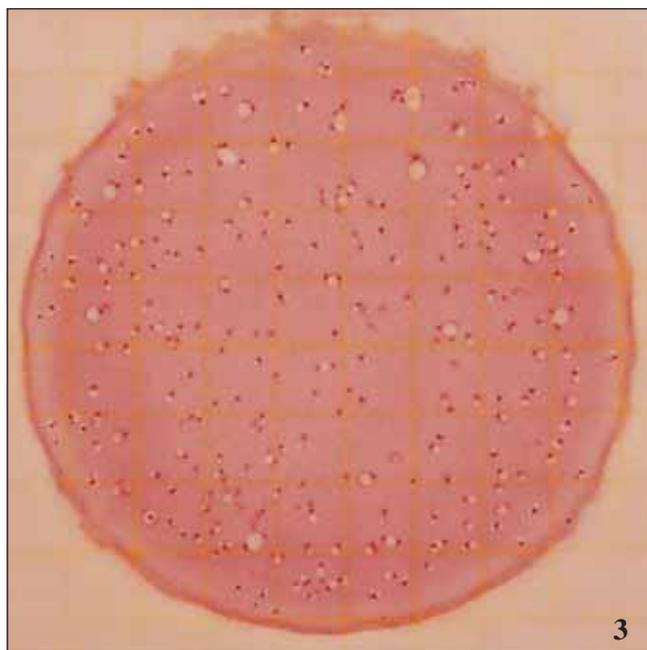
Numero di colonie che producono gas : 82

Numero di colonie senza gas : 8

Conteggio totale: 90

La forma delle bolle può variare: vedere i cerchi 1 e 2.

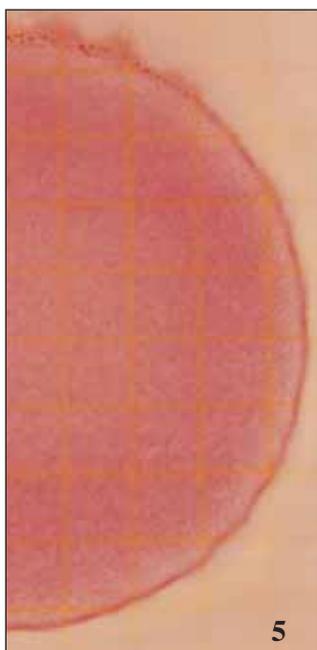
A volte il gas prodotto rompe la colonia cosicchè la colonia "delinea" la bolla.



Conteggio totale stimato: 320

L'area di crescita circolare è di circa 60 cm². Si possono effettuare delle stime sulle piastre contenenti più di 150 colonie contando il numero di colonie in uno o più quadrati. Moltiplicare il numero medio per 60 per determinare il numero stimato per ciascuna piastra.

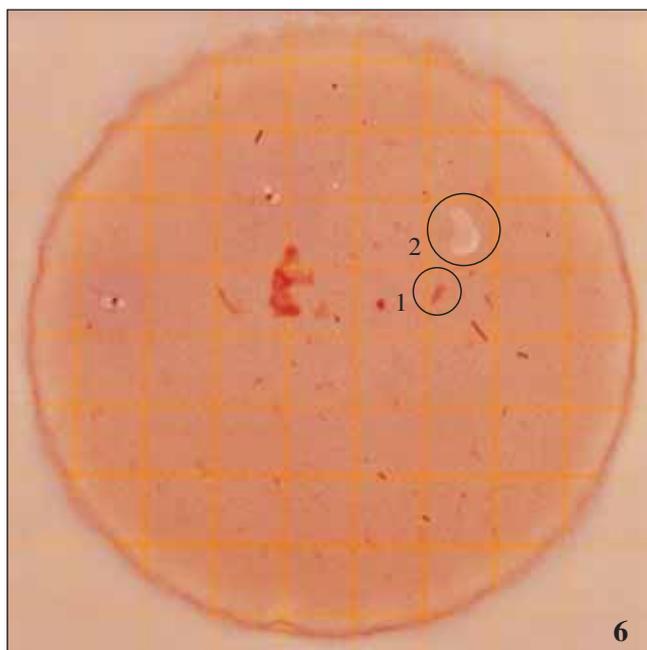
Si consiglia un'ulteriore diluizione del campione per ottenere un conteggio più accurato.



Numero di colonie molto elevato (TNTC - Too Numerous To Count)

Le piastre Petrifilm HSCC con un numero molto elevato di colonie hanno una o più delle seguenti caratteristiche: numerose piccole colonie, molte bolle di gas e il colore del gel più scuro.

Si consiglia un'ulteriore diluizione del campione per ottenere un conteggio più accurato.



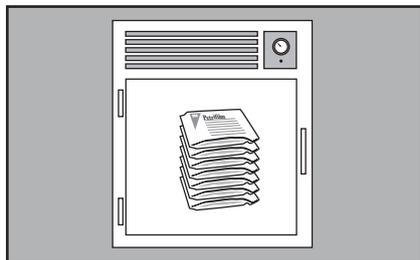
Numero di colonie che producono gas : 2

Pezzi di prodotto alimentare eventualmente presenti hanno una forma irregolare e non sono associati a bolle di gas. (vedere il cerchio 1).

Le bolle artefatte possono essere dovute ad un inoculo non corretto della piastra Petrifilm HSCC. Hanno forma irregolare e non sono associate ad una colonia (Vedere cerchio 2).



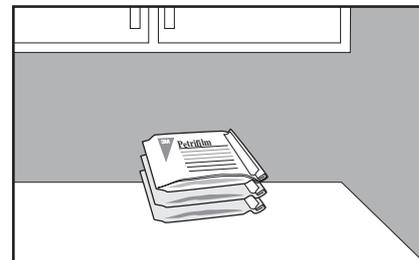
Stoccaggio



1 **Conservare** le confezioni chiuse ad una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$. Utilizzare le piastre entro la data di scadenza indicata sulla confezione. In ambienti con umidità elevata dove è possibile la formazione di condensa, le confezioni devono essere riportate a temperatura ambiente prima dell'apertura.

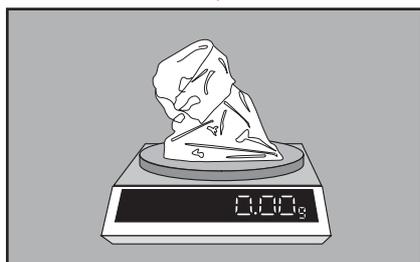


2 Per sigillare le confezioni aperte, ripiegare l'apertura e sigillarla con nastro adesivo.

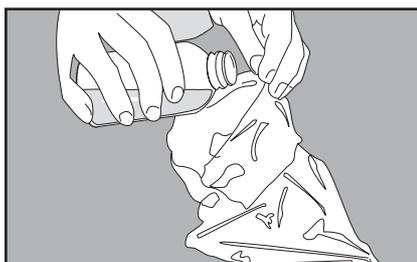


3 Conservare le confezioni così richiuse a $\leq 25^{\circ}\text{C}$ e $\leq 50\%$ RH. **Non conservare in frigorifero le confezioni aperte.** Usare le piastre Petrifilm entro un mese dall'apertura.

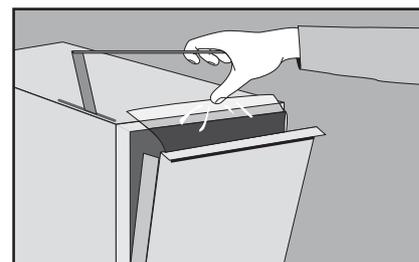
Preparazione del Campione



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



5 Se necessario, usare i diluenti **sterili** appropriati: diluente al sale peptonato (metodo ISO 6887) (Diluente Maximum Recovery), tampone fosfato Butterfield's (tampone fosfato IDF, KH_2PO_4 a 0,0425 g/L, regolato a pH 7,2), 0,1% acqua peptonata (metodo ISO 6579), soluzione salina (0,85 - 0,90%), brodo di Lethen senza bisolfito o acqua distillata.



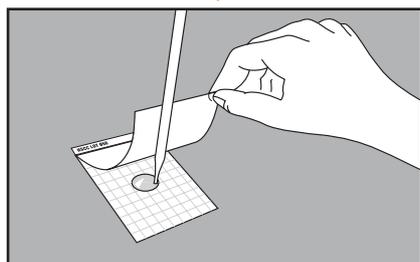
6 Miscelare od omogeneizzare il campione secondo le procedure correnti.

Regolare il pH del campione diluito tra 6,5 e 7,5:

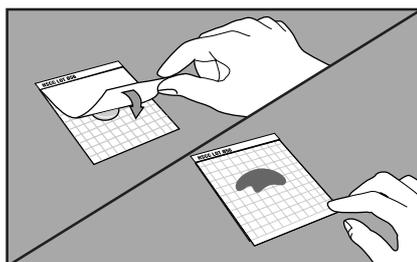
- per i prodotti acidi, usare NaOH 1N,
- per i prodotti alcalini, usare HCl 1N.

Non usare tamponi contenenti citrato, bisolfito o tiosolfato, dato che possono inibire la crescita

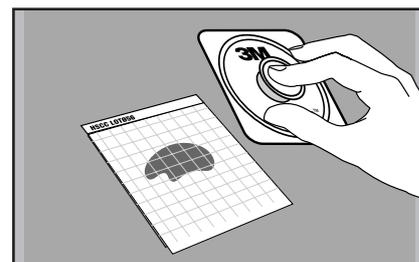
Inoculo



7 Posizionare la piastra Petrifilm su una superficie **piana**. Sollevare il film superiore. Tenendo una pipetta **perpendicolare** alla piastra Petrifilm, seminare 5 ml di campione nella parte centrale del film basale.

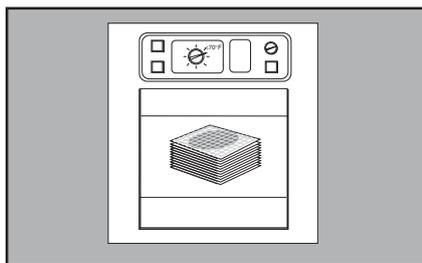


8 **Arrotolare attentamente** il film superiore per evitare di intrappolare bolle d'aria. **Non** lasciar cadere il film superiore.



9 Posizionare il diffusore di plastica specifico per le piastre Petrifilm HSCC sul film superiore, sopra il campione seminato. Esercitare una **leggera** pressione sul manico del diffusore. Non torcere o far scivolare il diffusore. Sollevare il diffusore. Attendere da 2 a 5 minuti per consentire al gel di solidificare.

Incubazione



10 Incubare le piastre con il lato trasparente verso l'alto, in pile di massimo 10 piastre. Tempi e temperature d'incubazione variano secondo il metodo di riferimento.

Metodi maggiormente utilizzati in Europa:

- Metodo validato AFNOR 3M 01/7-03/99:

Incubare $24h \pm 2h$ a $30^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ o $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ o $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, per coliformi totali.

- Incubare $24h \pm 2h$ a $44^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, per coliformi termotolleranti.

E' necessaria l'umidificazione dell'incubatore a queste temperature elevate.

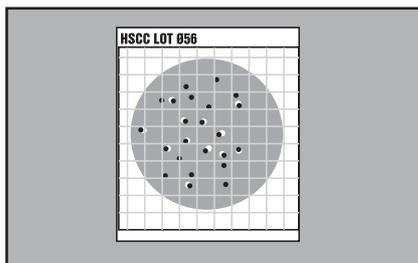
Metodi maggiormente utilizzati negli Stati Uniti:

- Incubare $24h \pm 2h$ a $32^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ (prodotti lattiero-caseari)

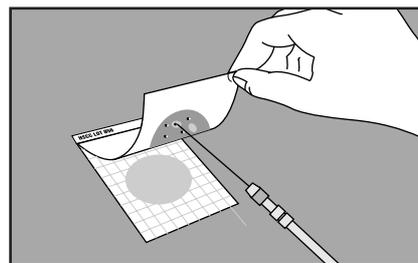
- Incubare $24h \pm 2h$ a $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ (tutti gli alimenti, eccetto i lattiero-caseari)

*vedere le note informative all'interno della confezione.

Interpretazione



11 Il conteggio delle colonie sulle piastre Petrifilm può essere fatto con un conta-colonie standard o con un qualsiasi altro tipo di ingranditore. Per la lettura dei risultati, consultare la sezione Guida all'interpretazione.



12 Le colonie possono essere isolate per un'identificazione successiva. Sollevare il film di copertura e prelevare la colonia dal gel.

Diluizioni

Diluizioni raccomandate:

- per prodotti caseari fermentati, burro e prodotti caseari secchi, è raccomandata una diluizione 1:10. In questo modo si ottiene una sensibilità di 2 coliformi per grammo.
- per panna, gelati, latte al cioccolato, panna fermentata, è raccomandata una diluizione 1:5. In questo modo si ottiene una sensibilità di 1 coliforme per grammo.
- latte crudo, pastorizzato e a basso contenuto di grassi possono essere seminati direttamente.

Riferimento di documento

<i>Data</i>	<i>Versione</i>
Maggio 1999	1.0

For Europe, please contact :
Laboratoires 3M Santé
Tel. : (33) 1 30 31 85 71
Fax : (33) 1 30 31 85 78

3M

**Prodotti per Microbiologia
3M Italia SPA**

Via S. Bovio 1/3
20090 Segrate
Milano
Tel.: (02) 70 351