

Ricerca e isolamento del *Clostridium perfringens* dagli alimenti con il sistema Linearcount Anaerobic



M. Deplano¹, M.E. Fadda¹, M.B. Pisano¹, A. Murgia¹, S. Murgia², S. Cosentino¹

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Medicina Clinica e Molecolare Sezione di Igiene - Università degli Studi di Cagliari - ² Microbiol snc - Cagliari

INTRODUZIONE

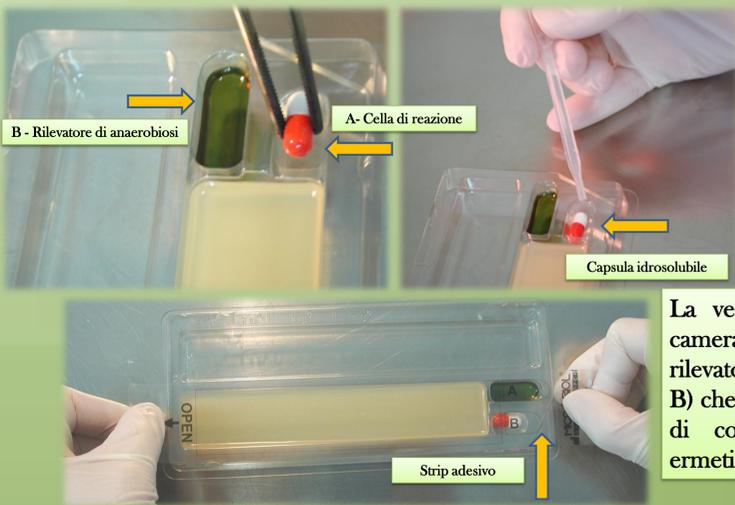
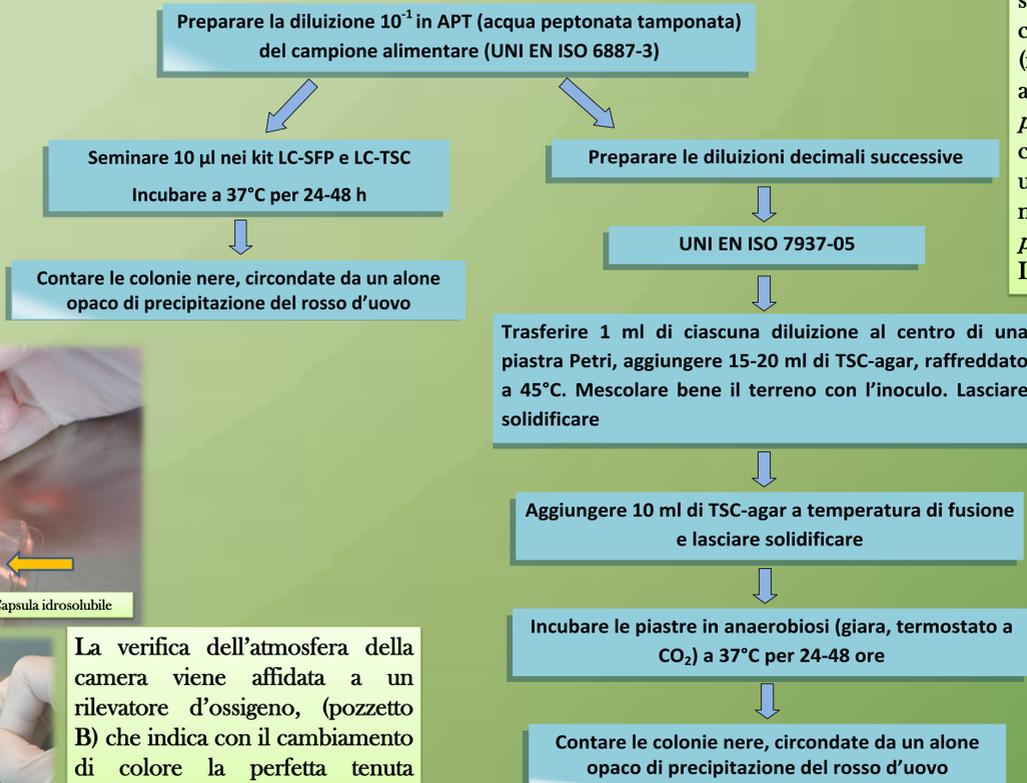
C. perfringens è il clostridio più comunemente coinvolto in episodi tossinfettivi di origine alimentare. I metodi analitici proposti dai vari organismi nazionali e internazionali per la ricerca di questo microorganismo in matrici alimentari e ambientali sono piuttosto laboriosi e prevedono diverse fasi con tempi di esecuzione piuttosto lunghi. Linearcount è un sistema integrato, brevettato dalla società Microbiol, destinato inizialmente alle urinocolture (Murgia et al. 1997). In seguito, opportune modifiche hanno permesso di sperimentare una nuova versione che permette l'isolamento di *Campylobacter* spp. ed altri microaerofili, denominata Linearcount 3MA (Lampis et al. 2004). Riportiamo in questo lavoro i risultati della sperimentazione di una ulteriore versione, il Linearcount Anaerobic, che permette di isolare il *C. perfringens* ed altri anaerobi da matrici alimentari in tempi più brevi rispetto ai metodi tradizionali, ma soprattutto evita l'utilizzo di termostati o giare per la coltivazione in condizioni di anaerobiosi.

METODI

Il kit è un sistema di semina lineare brevettato dalla società Microbiol snc (Macchiareddu, Cagliari), è costituito da una piastra in termoformato trasparente, con coperchio, in cui è inserito un pozzetto rettangolare contenente un terreno di coltura specifico per la crescita del *C. perfringens*. La semina si realizza tramite un'ansa da 10 µl, depositando la goccia del campione tal quale nell'estremità sinistra del pozzetto e strisciando per tutta la sua lunghezza: in questo modo è possibile ricavare il titolo batterico dalla misura in centimetri della striscia di batteri cresciuti, a partire dall'inizio della semina sino al fronte di crescita a confluenza. Questo nuovo sistema di semina permette la conta e l'isolamento di *C. perfringens* direttamente dall'alimento tal quale senza l'allestimento di diluizioni scalari

L'efficienza del kit è stata valutata testando contemporaneamente la produttività e la selettività di due terreni specifici per il *C. perfringens*: il tryptose sulphite cycloserine agar (TSC) e il Shahidi Ferguson *perfringens* agar (SFP), entrambi arricchiti con il supplemento Egg Yolk Emulsion. A tal fine campioni di diverse matrici alimentari (mitili, latte UHT e carne) sono stati artificialmente contaminati con ceppi di *C. perfringens* e altri solfito-riduttori a diverse concentrazioni 10⁴ e 10⁶ ufc/g e seminati utilizzando sia il sistema Linearcount che il metodo orizzontale per la conta di *C. perfringens*, secondo la norma UNI EN ISO 7937:2005.

L'incubazione non prevede l'impiego di giare, buste o costosi incubatori a CO₂. L'anaerobiosi viene creata direttamente nel terreno introducendo una capsula idrosolubile nel pozzetto A, contenente una miscela di sostanze atte a produrre un'adeguata concentrazione di CO₂. La successiva chiusura del terreno con un strip adesivo ne assicura il mantenimento per tutta la durata dell'incubazione.



La verifica dell'atmosfera della camera viene affidata a un rilevatore d'ossigeno, (pozzetto B) che indica con il cambiamento di colore la perfetta tenuta ermetica della camera.



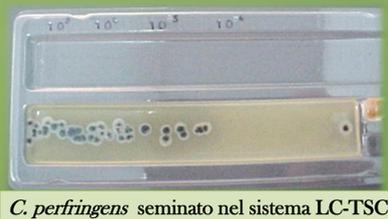
RISULTATI

Ceppi clostridi	Matrici alimentari			Totale ceppi sperimentazioni
	Mitili	Latte UHT	Carne	
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	7	6	5	18
<i>C. perfringens</i> DBSA*	5	3	1	9
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	4	2	2	8
<i>C. baratii</i> DBSB*	2	1	0	3
<i>C. bifermentans</i> DBSC*	2	1	0	3
<i>C. putrefaciens</i> DBSD*	2	1	0	3
Totale matrici	22	14	8	44

*Collezione ceppi isolati nel nostro laboratorio.

	Diluizione A (10 ⁶ ufc/g)			Diluizione B (10 ⁴ ufc/g)		
	LC-TSC	LC-SFP	Controllo*	LC-TSC	LC-SFP	Controllo*
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	83%	88%	84%	88%	88%	78%
<i>C. perfringens</i> DBSA	88%	100%	87%	100%	88%	78%
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	87%	87%	75%	100%	100%	75%
<i>C. baratii</i> DBSB	33%	33%	66%	66%	33%	0%
<i>C. bifermentans</i> DBSC	100%	33%	88%	66%	100%	88%
<i>C. putrefaciens</i> DBSD	33%	0%	88%	50%	50%	88%

*Norma UNI EN ISO7937:2005

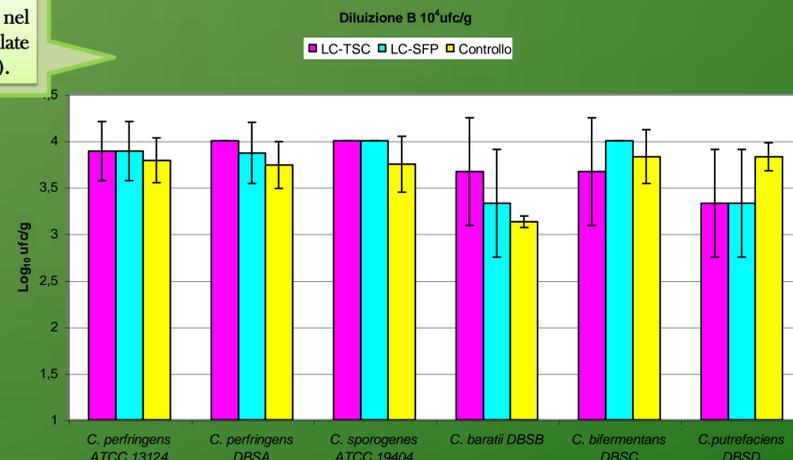
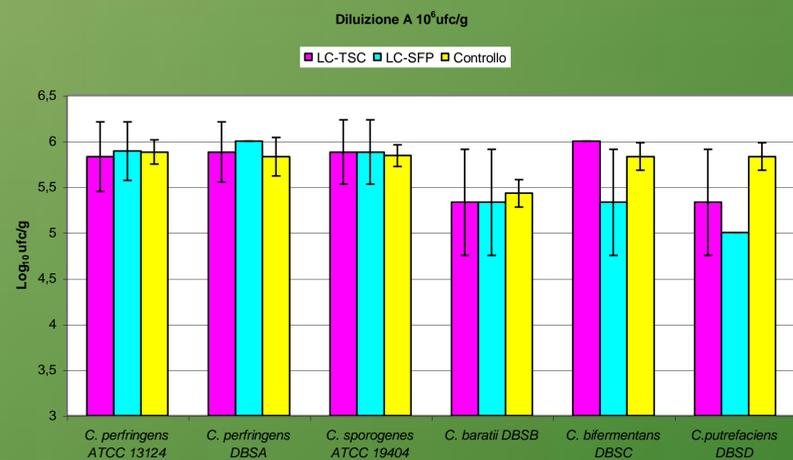


C. perfringens seminato nel sistema LC-TSC

Tabella 1 - Ceppi di clostridi solfito-riduttori e matrici alimentari utilizzati nella sperimentazione del nuovo sistema di semina Linearcount Anaerobic.

Figura 1 - Valutazione quantitativa della crescita dei clostridi solfito-riduttori seminati dalle due diluizioni nel sistema LC-TSC, e LC-SFP e nelle piastre inoculate secondo la norma UNI EN ISO 7937:2005 (controllo).

Tabella 2 - Valutazione quantitativa della crescita dei ceppi di clostridi solfito-riduttori seminati in Linearcount Anaerobic TSC e SFP rispetto al controllo in piastra.



L'efficienza di ricovero del sistema Linearcount Anaerobic è stata analizzata statisticamente con l'ANOVA-1 VIA (Analisi della varianza ad una via), utilizzando il software Graph Pad Prism Statistics vs. 3.00.

Bibliografia

- Murgia S., Manca C., Lampis G., Pompei R. "Linear-count: un nuovo sistema integrato per la conta e l'isolamento microbico nelle urinocolture"-Microbiologia Medica 1997;12-502-5
- Lampis G., Pittau C., Laconi S., Murgia S., Pompei R. "Culture and isolation of *Campylobacter* species by the Linearcount 3MA system" Ecology/environmental microbiology- Anaerobe 10 (2004), 213-215
- Norma UNI EN ISO 7937:2005 "Microbiologia di alimenti e mangimi per animali-Metodo orizzontale per la conta di *Clostridium perfringens*" Tecnica della conta delle colonie"
- Norma UNI EN ISO 6887-3 "Microbiologia di alimenti e mangimi per animali-Preparazione dei campioni di prova, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'analisi microbiologica"

CONCLUSIONI

- L'efficienza del kit è stata confermata sia in caso di alte concentrazioni che di basse concentrazioni di clostridi
- Maggiore semplicità della metodica che, analizzando il campione tal quale non prevede l'allestimento di numerose diluizioni e la semina in più piastre
- E' possibile seguire giornalmente la crescita dei clostridi senza dover aprire il supporto, che quindi può essere re-incubato
- Si evita sia l'utilizzo di giare, sia l'utilizzo di incubatori termostatati per anaerobiosi.