

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Metodi microbiologici tradizionali
e metodi molecolari per l'analisi
degli integratori alimentari
a base di o con probiotici per uso umano**

Paolo Aureli, Alfonsina Fiore, Concetta Scalfaro, Giovanna Franciosa
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN
08/36

Istituto Superiore di Sanità

Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano.

Paolo Aureli, Alfonsina Fiore, Concetta Scalfaro, Giovanna Franciosa

2008, ii, 63 p. Rapporti ISTISAN 08/36

Il presente rapporto, indirizzato in particolare ai laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti, descrive i metodi di analisi microbiologici e di biologia molecolare e i criteri per valutare la conformità degli integratori a base di o con probiotici, per uso umano. L'effetto benefico dovuto all'assunzione, in adeguate quantità, di microrganismi vivi denominati probiotici, ha portato al crescente aumento del consumo di preparazioni a base di o con probiotici; per questo motivo sta diventando sempre più importante garantirne la qualità numerando e tipizzando i microrganismi probiotici presenti in tali preparazioni. Fino ad oggi, la mancanza di metodi analitici per la numerazione differenziale dei probiotici negli integratori alimentari per uso umano ha solo raramente permesso ai laboratori del controllo ufficiale di verificarne la conformità alle Linee Guida 2005 del Ministero della Salute (Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Nutrizione e Sicurezza Alimentare).

Parole chiave: Probiotici, Integratori a base di o con probiotici, Metodi di analisi

Istituto Superiore di Sanità

Microbiological and molecular methods for analysis of probiotic based food supplements for human consumption.

Paolo Aureli, Alfonsina Fiore, Concetta Scalfaro, Giovanna Franciosa

2008, ii, 63 p. Rapporti ISTISAN 08/36

The present report, specifically directed to the official control laboratories, shows traditional and molecular methods and criteria for assessment of the compliance of probiotic food supplements intended for human consumption. The perceived health benefits associated to the conscious ingestion in adequate amounts of certain live microorganisms (named probiotics) have led to an increased consumption of products containing or consisting of mono- or mixed microbial cultures, therefore it is important to guarantee their quality to the consumers by counting and typing the probiotic microorganisms. At present, the official control of the probiotic food supplements to verify the compliance of the probiotic food supplements to the Guidelines 2005 for probiotic and prebiotic issued by Ministry of Health (Department of Veterinary Public Health, Nutrition and Food Safety) is rarely performed because of absence of analytical methods for the differential enumeration of probiotics in mixed culture preparations.

Key words: Probiotics, Probiotic based food supplements, Analytical methods

Per informazioni su questo documento scrivere a: paolo.aureli@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Aureli P, Fiore A, Scalfaro C, Franciosa G. *Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/36).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modiglia*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici

© Istituto Superiore di Sanità 2008

INDICE

Introduzione.....	1
Scopo del rapporto.....	3
Gli integratori alimentari	4
Campionamento.....	6
Fasi del campionamento	6
Quantità di materiale da prelevare	6
Fase del processo dove effettuare il prelievo.....	7
Modalità di trasporto e tempi di consegna del campione prelevato al laboratorio.....	7
Protocollo analitico consigliato.....	8
Screening con metodo molecolare delle specie indicate in etichetta mediante esame diretto del campione	9
Introduzione.....	9
Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto.....	11
Amplificazione del DNA batterico mediante PCR.....	11
Metodica di preparazione della miscela di reazione	11
Visualizzazione dell'amplificato mediante elettroforesi su gel d'agarosio.....	13
Preparazione del gel d'agarosio.....	14
Lettura dei risultati.....	14
Metodi per l'identificazione genetica di microrganismi probiotici	15
1. <i>Bacillus coagulans</i>	17
2. <i>Bifidobacterium bifidum</i>	18
3. <i>Bifidobacterium</i> spp.....	19
4. <i>Lactobacillus acidophilus</i> (primer Acido/Lac).....	20
5. <i>Lactobacillus acidophilus</i> (primer Idlc4F/Idl22R).....	21
6. <i>Lactobacillus casei</i>	22
7. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	23
8. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	24
9. <i>Lactobacillus helveticus</i>	25
10. <i>Lactobacillus kefir</i>	26
11. <i>Lactobacillus paracasei</i>	27
12. <i>Lactobacillus plantarum</i>	28
13. <i>Lactobacillus reuteri</i>	29
14. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	30
15. <i>Lactobacillus salivarius</i>	31
16. <i>Lactococcus lactis</i>	32
17. <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	33
18. <i>Streptococcus thermophilus</i>	34

Numerazione differenziale presuntiva delle specie microbiche probiotiche vive dichiarate in etichetta	35
Introduzione.....	35
Preparazione della diluizione iniziale e rivivificazione	35
Procedura di conteggio mediante tecnica della semina in superficie (<i>spreading-spatula method</i>).....	36
Numero di piastre di Petri per ogni diluizione.....	36
Numerazione delle colonie	36
Numerazione delle colonie prima dell'identificazione	36
Espressione dei risultati nel caso di assenza di crescita batterica	37
Metodi per la numerazione dei microrganismi probiotici	39
19. Genere <i>bacillus</i>	41
20. Genere <i>bifidobacterium</i>	42
21. Genere <i>lactobacillus</i>	43
22. Genere <i>lactococcus</i>	46
23. Genere <i>propionibacterium</i>	47
24. Genere <i>streptococcus</i>	48
Conferma genetica di specie.....	49
Introduzione.....	49
Preparazione del DNA da coltura batterica	49
Modalità di conteggio delle colonie dopo l'identificazione	50
Conclusioni.....	52
Bibliografia.....	53
Appendice	
Terreni di coltura	57

INTRODUZIONE

L'assunzione volontaria di batteri vivi non patogeni, generalmente ma non esclusivamente sottoforma di prodotti lattiero-caseari, è una pratica diffusa nell'alimentazione umana che risale al secolo scorso. Oggi grazie ad una serie crescente di rigorose ricerche scientifiche sugli effetti benefici e di evidenze che confermano tale efficacia nel prevenire/trattare alcune malattie è andata aumentando tra i consumatori l'abitudine di includere determinati tipi di batteri, denominati **probiotici**, nella dieta proprio per il loro potenziale benefico.

Va sottolineato il fatto che evidenze di efficacia legate all'assunzione con la dieta di probiotici sono state consistentemente confermate solo per un piccolo numero di condizioni. Tuttavia la percezione dei consumatori sugli effetti benefici che essi apporterebbero ha finito per favorirne un uso più ampio rispetto a quello che si potrebbe prevedere se fosse associato a circoscritte situazioni, e gli integratori a base di o con probiotici sono diventati una voce sempre più importante nel mercato degli integratori alimentari.

Secondo la più recente e accreditata definizione, il termine *probiotici* è riservato a quei *microrganismi vivi in grado di assicurare effetti benefici alla salute dei consumatori quando assunti per via orale in quantità appropriata* (1). Gli effetti benefici che essi esercitano sono stati attribuiti all'azione riequilibratrice che svolgono sulla flora microbica intestinale o sulle sue attività, all'influenza sulla risposta immunitaria della mucosa intestinale o all'integrazione di specifiche attività enzimatiche.

Per la verità, negli ultimi 30 anni sono state proposte diverse definizioni del descrittore *probiotico*, con l'intento di migliorarne e integrarne gli attributi qualificanti stabiliti dalle precedenti definizioni, man mano che si acquisivano ulteriori conoscenze sulla fisiologia di taluni microrganismi e sul loro ruolo terapeutico e/o benefico. In particolare, si è partiti con l'attributo di ... *contribute to intestinal microbial balance* (contribuire all'equilibrio della flora intestinale) (2) per passare dapprima a considerare il requisito della vitalità unito a quello dell'effetto benefico per la salute dell'ospite (3), indipendentemente dal fatto che i microrganismi potevano essere colture disidratate o latti fermentati, poi al fatto che i batteri assunti dovevano essere presenti nei prodotti, vivi e in numero adeguato per poter assicurare l'effetto benefico e al fatto che miglioravano l'azione complessiva della flora intestinale (4-6). Sulla base di queste definizioni un rilevante numero di microrganismi è considerato probiotico, fatto questo che sta comportando l'effettuazione di specifici e validati studi di efficacia per la loro conferma.

La maggior parte dei microrganismi probiotici sono specie, più frequentemente solo determinati ceppi, appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Si tratta per lo più di microrganismi isolati dai *microbiota* del tratto intestinale dell'uomo, ma sono riconosciuti probiotici anche microrganismi che originano da habitat non umani e che sono utilizzati nella preparazione di prodotti lattiero-caseari fermentati. Oltre ai ceppi e alle specie appartenenti ai due suindicati generi, l'attributo probiotico è stato riconosciuto anche a microrganismi dei generi, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* ed *Enterococcus*. Tuttavia, sono state avanzate perplessità sui microrganismi probiotici appartenenti agli ultimi due generi, in particolare sul genere *Enterococcus*, per la presenza di specie patogene. Sono considerati probiotici anche taluni lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*.

A livello internazionale, i criteri con cui stabilire la sicurezza d'uso di un ceppo batterico sono stati autorevolmente proposti dal *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food* tenutosi nell'ottobre 2001 a Cordoba in Argentina (7). Successivamente un altro gruppo di lavoro FAO/WHO (*Working Group on*

Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food), nel maggio 2002, a London, Canada (8), ha, tra le altre cose, identificato e stabilito i requisiti minimi con cui poter qualificare “probiotico”, in maniera oggettiva, una specie microbica.

A livello nazionale, la Commissione Consultiva per gli integratori alimentari e i prodotti destinati ad un'alimentazione particolare del Ministero della Salute ha elaborato una prima linea guida nel 2002 che, più recentemente alla luce dei criteri valutativi raccomandati dai gruppi di esperti FAO/OMS, è stata sottoposta ad aggiornamento. Le nuove Linee Guida ministeriali (9) emanate nel dicembre 2005 che hanno recepito tutti gli elementi di rilievo dei suddetti documenti FAO/WHO, rappresentano il punto di riferimento obbligato per qualunque impresa interessata al settore nel momento in cui notifica l'etichetta di un integratore a base di probiotici al Ministero della Salute (10) e redige un proprio piano di autocontrollo. Inoltre, le stesse linee guida rappresentano il punto di partenza obbligato per qualunque programma di valutazione di conformità degli integratori alimentari con probiotici e di verifica dei piani di autocontrollo delle aziende produttrici da parte delle autorità preposte al controllo ufficiale.

Si tratta di un documento che introduce più precisi elementi di valutazione dei microrganismi probiotici così riassumibili:

- sicurezza per l'impiego nell'uomo secondo i criteri indicati dalla *European Food Safety Authority* (EFSA); in particolare, assenza di determinanti genetici di antibiotico-resistenze acquisite e/o trasmissibili (11);
- attività e vitalità a livello intestinale in quantità tale da giustificare gli eventuali effetti benefici osservati in studi di efficacia;
- persistenza e moltiplicazione nell'intestino umano;
- capacità di conferire un beneficio fisiologico.

Ovviamente il tutto preceduto dalla verifica dell'identità tassonomica e dalla caratterizzazione dei microrganismi a livello di specie e di ceppo integrando la verifica fenotipica con l'analisi dei caratteri genotipici mediante tecniche per lo studio del DNA batterico specificatamente indicate nelle citate Linee Guida.

In base a tale documento un integratore con microrganismi probiotici è da ritenersi conforme se:

- la quantità di cellule vive per porzione/posologia giornaliera è almeno di 10^9 ;
- i microrganismi sono vitali;
- la specie è correttamente indicata in etichetta utilizzando le denominazioni specificate in nomenclature tassonomiche internazionalmente riconosciute;
- la/le specie microbica/he è/sono sicura/e per l'impiego umano;
- i germi patogeni sono assenti.

SCOPO DEL RAPPORTO

Dato il crescente aumento del consumo di preparazioni a base di o con probiotici, sta diventando sempre più importante garantirne la qualità, assicurandone tra l'altro la verifica microbiologica di conformità alle linee guida ministeriali. Infatti, in base a quanto riportato in tale documento, è necessario che le preparazioni probiotiche, per poter avere l'effetto benefico vantato, contengano microrganismi vivi e vitali in quantità non inferiori alla concentrazione minima stabilita per dose/posologia, per tutto il periodo di vita commerciale.

Appare pertanto evidente la necessità di sottoporre a controllo tali preparazioni, al fine di assicurare la soddisfazione di tali requisiti e tutelare i consumatori.

La numerazione differenziale dei batteri probiotici nelle preparazioni che contengono più specie simili è però indubbiamente difficoltosa e, la mancanza di una raccolta organica e omogenea di procedure analitiche specifiche per tale valutazione, a disposizione dei laboratori del controllo ufficiale, non ha permesso finora la realizzazione dei programmi di monitoraggio annuali di tali prodotti.

Per questa ragione si è ritenuto necessario realizzare il presente documento nel quale vengono descritti un protocollo operativo e le metodiche analitiche adeguate alla valutazione di conformità degli integratori alimentari a base o con probiotici, limitatamente alle specie considerate nel presente lavoro. Si tratta di una raccolta di metodi verificati e validati in laboratorio secondo riconosciute procedure (12), dagli autori del presente documento.

Consapevoli dell'esistenza di un'ampia varietà di terreni colturali per la ricerca di microrganismi probiotici da integratori alimentari, quelli da noi scelti sono i terreni risultati più idonei allo scopo.

Si precisa che anche se preparazioni farmaceutiche, dispositivi medici e alimenti qualificano probiotici i microrganismi che li compongono/caratterizzano, i criteri di valutazione di conformità di seguito riportati e le metodiche analitiche non possono al momento essere considerati per essi adatte.

GLI INTEGRATORI ALIMENTARI

Molte specie microbiche per talune loro proprietà hanno trovato impiego in vari settori industriali, quali quello del farmaco, quello dei presidi medico-chirurgici e, infine, quello dell'alimentazione umana e animale. Ovviamente per ognuno di essi l'impiego dei microrganismi è subordinato al rispetto di una serie di norme che tutelano la salute dei consumatori e, per talune applicazioni, all'assicurazione dell'efficacia.

Nel settore alimentare, i microrganismi hanno trovato impiego nella produzione di ingredienti alimentari, in quella dei coadiuvanti tecnologici e nella produzione di alimenti fermentati, rispettando sempre le regole che governano la produzione e l'immissione in commercio degli alimenti nel caso in cui per le specie microbiche impiegate fosse possibile vantare una lunga tradizione d'uso, mentre per quelle che non presentano tale requisito viene richiesta una specifica valutazione di sicurezza (regolamento CE 258/1997).

Un particolare e recente campo di applicazione dei microrganismi è quello della produzione di integratori alimentari. Da alcuni anni i microrganismi che vantano effetti benefici e che vengono commercializzati in forma diversa dagli alimenti, sono stati inclusi dal Ministero della Sanità prima e Salute poi, tra gli integratori alimentari e conseguentemente soggetti al rispetto delle regole di questi particolari prodotti alimentari. Questa scelta ministeriale è stata rafforzata dalla recente pubblicazione della direttiva 2002/46/CE del 10 giugno 2002 (13), recepita in Italia con il DM 21 maggio 2004 n.169, che definisce gli integratori alimentari, come *“prodotti alimentari destinati ad integrare la dieta normale e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive o di altre sostanze aventi effetto nutritivo o fisiologico, sia monocomposti che pluricomposti, in forme di dosaggio, vale a dire in forme di commercializzazione quali capsule, pastiglie, compresse, pillole e simili, polveri in bustina, liquidi contenuti in fiale, flaconi a contagocce e altre forme simili, di liquidi o polveri destinati ad essere assunti in piccoli quantitativi unitari”*. In altre parole, gli integratori alimentari sono un complesso di prodotti il cui uso risponde all'obiettivo di migliorare il metabolismo e le funzioni fisiologiche dell'organismo attraverso un insieme di effetti aggiuntivi alle normali funzioni nutrizionali.

In questo senso, gli integratori, pur non essendo alimenti dietetici a tutti gli effetti in quanto non destinati a rispondere ad esigenze nutrizionali o condizioni fisiologiche particolari, sono in ogni caso prodotti dell'area alimentare e come tali assoggettati ai criteri di conformità e sicurezza da verificare con i criteri propri di tutti gli alimenti. A questo proposito, il Ministero della Salute, Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza Alimentare, ha varato, già da qualche anno, un piano annuale di vigilanza degli integratori alimentari, commercializzati come prodotti alimentari e presentati come tali (14), indirizzato alle Regioni. Gli integratori a base di probiotici e/o preparazioni alimentari contenenti probiotici stanno incontrando un crescente favore tra i consumatori proprio per i benefici effetti ad essi attribuiti e/o dai consumatori percepiti. Gli alimenti probiotici sono una categoria di integratori caratterizzata dalla presenza di specie microbiche particolari alla cui assunzione si riconosce la capacità di favorire lo stato di benessere del consumatore.

La possibilità che una qualunque specie o ceppo probiotico possa essere impiegato in alimentazione umana è subordinata alla sua sicurezza d'uso. Su tale aspetto, del tutto recentemente, si è pronunciata l'EFSA (11) che ha introdotto il concetto di *qualified presumption of safety* (QPS), per riconoscere quei microrganismi o loro componenti che possono essere utilizzati negli alimenti o per la produzione di alimenti, in quanto accompagnate da una ben stabilita storia e *status* di sicurezza, senza che l'autorità richieda un'opportuna

documentazione o ne preveda una particolare valutazione autorizzativa per concederne l'utilizzo.

Si tratta di un approccio simile al sistema americano GRAS (*generally regnized as safe*) da cui si differenzia per il fatto che l'attributo di QPS è riconosciuto a tutti i microrganismi della stessa specie e non al singolo ceppo e, conseguentemente, l'autorizzazione all'impiego non è propria ed esclusiva dell'impresa richiedente.

Per poter ottenere tale riconoscimento, però, i microrganismi debbono soddisfare alcuni criteri, in particolare non veicolare determinanti di resistenza agli antibiotici. Si tratta di un importante criterio di sicurezza in quanto i microrganismi che portano geni per la resistenza agli antibiotici possono trasferirli ai germi commensali o patogeni, con pericolose implicazioni per la sanità pubblica.

CAMPIONAMENTO

La verifica di conformità al dichiarato in etichetta di integratori con microrganismi probiotici (relativamente alla specie, al numero di microrganismi e alla loro sicurezza d'uso), deve essere effettuata analizzando un'appropriata quantità di prodotto ottenuta prelevando un numero di confezioni (campione globale), conformemente alla metodologia di seguito descritta.

Il campione globale così ottenuto viene considerato rappresentativo del lotto. A questo proposito, si ritiene appropriato applicare un tipo di campionamento per **randomizzazione semplice** (o campionamento casuale semplice). A tal fine il campione viene scelto in modo tale da garantire la casualità della selezione.

In mancanza di una specifica definizione di lotto, per tali prodotti è stata adottata la definizione di lotto e le altre definizioni accessorie che seguono:

- *Partita/lotto*
quantità identificabile di integratore alimentare contenente probiotici, consegnata in un'unica volta, per la quale è stata accertata, dall'addetto al controllo ufficiale, la presenza di caratteristiche comuni, quali l'origine, la/le specie microbica/e, il tipo d'imballaggio, il confezionatore, lo spedizioniere, la marcatura, la data di scadenza.
- *Sottopartita*
porzione di una grande partita designata per l'applicazione delle modalità di prelievo. Ciascuna sottopartita deve essere fisicamente separata e identificabile.
- *Campione globale*
campione ottenuto riunendo tutte le aliquote prelevate dalla partita o dalla sottopartita.
- *Aliquota*
quantitativo di materiale prelevato in un solo punto della partita o della sottopartita (la/le confezione/i), corrispondente a ciascuna delle parti equivalenti in cui deve essere suddiviso il campione globale. Ogni aliquota corrispondente ad un quarto/quinto del campione globale e deve essere sigillata con piombi.
- *Unità campionaria*
unità elementare del campione (la singola forma commerciale o di dosaggio di cui alla definizione di integratore). Una o più unità campionarie vanno a costituire un'aliquota.

Fasi del campionamento

Prelievo

La quantità di materiale da prelevare (campione globale = numero di confezioni) deve essere sufficiente per eseguire tutte le determinazioni microbiologiche previste.

Nel caso in cui oltre ai microrganismi probiotici sia prevista la ricerca dei patogeni, quali Salmonella e Listeria, la quantità minima di materiale necessaria per lo svolgimento delle analisi è di 60 grammi e/o mL (25 grammi e/o mL per la ricerca di Salmonella, grammi e/o mL per la ricerca di Listeria, 10 grammi e/o mL almeno per la numerazione dei microrganismi probiotici = 1 aliquota), da moltiplicare per 4/5 in modo da ottenere il numero complessivo delle aliquote previste dalla normativa vigente (15).

Dove effettuare il prelievo

Alla produzione il prelievo deve essere effettuato alla fine del confezionamento; al dettaglio, invece, si raccomanda di effettuare il campionamento presso i grossisti.

In quest'ultimo caso, adottare le condizioni di prelievo che garantiscano una sufficiente rappresentatività del lotto oggetto del campionamento.

Modalità di trasporto e tempi di consegna al laboratorio del campione prelevato

Per garantire che il campione prelevato giunga al laboratorio di analisi nelle stesse condizioni in cui si trovava al momento del prelievo, è necessario assicurare idonee condizioni di trasporto, che rispettino le temperature di conservazione indicate nell'etichetta di ciascun prodotto.

Il campione correttamente prelevato e trasportato deve giungere al laboratorio nel minor tempo possibile.

PROTOCOLLO ANALITICO CONSIGLIATO

Il protocollo analitico illustrato nel presente documento è suddiviso in fasi sequenziali (Figura 1). Nella prima fase, le analisi molecolari vengono direttamente effettuate sul DNA totale estratto dal campione, al fine di identificare i diversi gruppi tassonomici dichiarati in etichetta. Con la seconda fase, propriamente microbiologica, viene verificata la vitalità e il numero presuntivo delle specie microbiche mediante conta su terreni differenziali e selettivi. Nelle fasi successive le colture vengono sottoposte a conferma dell'identità e del numero.

Le fasi del protocollo analitico, sono riportate in uno schema riassuntivo, per rendere più agevole la visualizzazione dei principali passaggi da effettuare.

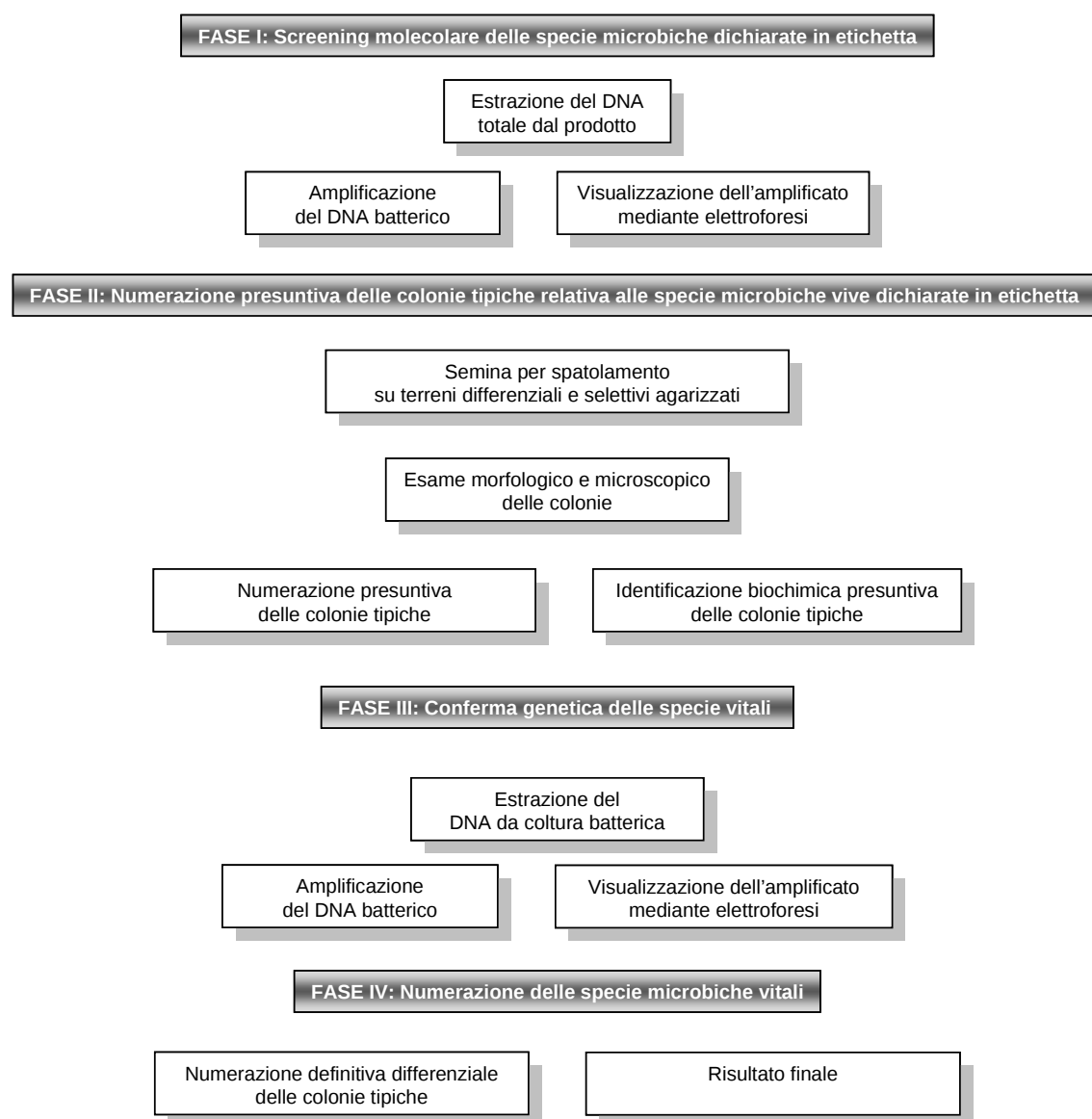


Figura 1. Schema riassuntivo delle principali fasi del protocollo analitico

SCREENING CON METODO MOLECOLARE DELLE SPECIE INDICATE IN ETICHETTA MEDIANTE ESAME DIRETTO DEL CAMPIONE

Introduzione

Il fatto che gli integratori alimentari vengano commercializzati utilizzando forme tipicamente farmaceutiche e non substrati alimentari su cui i microrganismi una volta moltiplicati possono essere distribuiti, impone l'adozione di accorgimenti tecnologici tesi a conservare la vitalità delle specie utilizzate e la loro durabilità per un ampio periodo di tempo.

Varie procedure possono essere utilizzate a questo fine, per lo più riconducibili all'essiccamento della coltura. Questo può comportare una riduzione della vitalità per effetto di più o meno importanti lesioni cellulari variabili da genere a genere e addirittura da specie a specie. In particolare nel caso di preparazioni con colture miste, vi è la necessità di stabilire se nella materia prima, nel semilavorato o nel prodotto finito, una o più specie siano morte o se, per un qualsiasi errore nella miscelazione delle colture, una o più specie siano riscontrabili con i test di vitalità.

Il ricorso ai metodi molecolari appare, pertanto, una scelta obbligata; essi permettono, infatti, di fugare ogni dubbio sulla reale presenza di tutte le specie previste, poiché il DNA rimane essenzialmente stabile e non è influenzato dalle condizioni di coltura, né suscettibile, almeno a breve termine, agli eventuali stress ambientali.

In particolare, i geni che codificano l'rRNA (RNA ribosomiale) (5S, 16S e 23S) sono tra i più conservati nel genoma dei microrganismi, sono presenti in un elevato numero di copie, sono ubiquitari ed essenziali per tutte le funzioni cellulari; oltre alle regioni conservate, le sequenze dei geni per l'rRNA comprendono motivi altamente variabili, presenti unicamente in certi gruppi tassonomici, che riflettono le distanze filogenetiche fra i microrganismi. Queste caratteristiche rendono l'analisi dell'rRNA lo studio più utilizzato per l'identificazione tassonomica dei microrganismi.

Il metodo molecolare adottato è stato quello dell'amplificazione dei geni codificanti l'rRNA mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La scelta di *primer* (corti oligonucleotidi complementari alla regione d'interesse), specifici per le zone polimorfiche dell'rDNA, permette l'amplificazione genetica specificamente dei microrganismi che posseggono quelle regioni, e conseguentemente il loro riconoscimento al grado tassonomico desiderato (genere, specie, e talvolta fino a sottospecie). In alcuni casi sono stati selezionati target diversi dall'rRNA, sulla base della specificità riportata in letteratura.

I *primer* specifici per l'identificazione delle specie batteriche (Tabella 1), sono stati selezionati dalla letteratura scientifica disponibile. Per l'identificazione accurata di alcune specie batteriche, sono stati utilizzate diverse coppie di *primer*. Solo nel caso di *Bacillus coagulans* e di *Lactobacillus kefir*, non essendo disponibili dati in letteratura, i *primer* sono stati selezionati sulla base delle sequenze del 16S rDNA per *B. coagulans* e del gene per la subunità α della RNA polymerase (*rpoA*) per *Lactobacillus kefir*, presenti in banca dati.

Tabella 1. Primer utilizzati per l'identificazione di specie dei microrganismi probiotici

Gruppo tassonomico	Sigla e sequenza dei primer	Target	(bp)*	Rif. bibl.
<i>Bacillus coagulans</i>	Spo3: 5'-TCT TGC GGC TCA ACC GCA AGC GG-3' Spo4: 5'-TGC AGG CGG GTT GCA GCC TGC-3'	16S rDNA	720	/
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Idb21F: 5'-TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCT-3' Idbc1R: 5'-ATC CGA ACT GAG ACC GGT T-3'	16S-23S IS ^a	1018	(16)
<i>Bifidobacterium</i> spp	BifidF: 5'-CTC CTG GAA ACG GGT GG-3' BifidR: 5'-GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A-3'	16S-23S IS ^a	563	(17)
<i>L. acidophilus</i> ^b	Acido: 5'-TGA ACC AAC AGA TTC ACT TC-3' Lac: 5'-TGA CGA CAG CCA TGC ACC A-3'	16S rDNA	1000	(18)
	Idlc4F: 5'-AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC-3' Idl22R: 5'-AACTATCGCTTACGCTACCACTTTGC-3'	16S-23S IS ^a	606	(19)
<i>L. casei</i>	W1: 5'-TGC ACT GAG ATT CGA CTT AA-3' Y2: 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	16S rDNA	295	(20)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Ldel7: 5'-ACA GAT GGA TGG AGA GCA GA-3' Lac2: 5'-CCT CTT CGC TCG CCG CTA CT-3'	16S rDNA	450	(21)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Lb1: 5'-AAA AAT GAA GTT GTT TAA AGT AGG TA-3' Llb1: 5'-AAG TCT GTC CTC TGG CTG G-3'	pepI ^c	1600	(22)
<i>L. fermentum</i>	Ferm1: 5'-GTT GTT CGC ATG AAC AAC GCT TAA-3' Lowlac: 5'-CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT-3'	16S rDNA	889	(23)
<i>L. helveticus</i>	Tri f: 5'-TCT TAT TAC GCA ATG GAC CAA-3' Tri r: 5'-AAT ACC GTT CTT GAG GTT AGA-3'	HtrA	918	(24)
<i>L. kefir</i>	LK1: 5'CAA CAA TCA AAG GGG TTG TTG-3' Lk2: 5'TCA CTA GGA GTA ATT GAA CCA-3'	RpoA	500	(25)
<i>L. paracasei</i>	W2: 5'-CCGAGATTCAACATGG-3' Y2: 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	16S rDNA	295	(20)
<i>L. plantarum</i>	Plant: 5'-ATC ATG ATT TAC ATT TGA GTG-3' Lowlac: 5'-CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT-3'	16S rDNA	996	(23)
<i>L. reuteri</i>	Reut1: 5'-TGA ATT GAC GAT GGA TCA CCA GTG-3' Lowlac: 5'-CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT-3'	16S rDNA	1000	(23)
<i>L. rhamnosus</i>	W3: 5'-TGC ATC TTG ATT TAA TTT TG-3' Y2: 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	16S rDNA	295	(20)
<i>L. salivarius</i>	Sal1: 5'-ATT CAC TCG TAA GAA GT-3' Lowlac: 5'-CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT-3'	16S rDNA	993	(23)
<i>Lactococcus lactis</i>	G1: 5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3' L1: 5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3'	16S-23S IS ^a	380	(26)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Pffl: 5'-GTA CTG CTG GTG CCC TG-3' Prfll: 5'TAG CTT GCT ACA CAA AAC TC-3' Pfrl: 5'AGG AGC CTT TTC GCC ATC-3' Prfll: 5'TAG CTT GCT ACA CAA AAC TC-3'	16S rDNA 16S-23S IS ^a	241 346	(27)
<i>S. thermophilus</i>	Thl: 5'-ACG GAA TGT ACT TGA GTT TC-3' Thll: 5'-TTT GGC CTT TCG ACC TAA C-3'	16S-23S IS ^a	600	(28)

* base pair

(a) Intergenic Sequence

(b) sensu strictu

(c) Gene per la prolina-imino peptidasi

Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto

Per procedere all'estrazione del DNA totale dal campione, possono essere utilizzati vari kit commerciali (quali ad esempio QIAamp DNA stool Mini Kit - Qiagen; Nucleospin Tissue kit - Macherey Nagel o equivalenti), mediante i quali il DNA, rilasciato dalle cellule che subiscono la lisi della parete e della membrana, viene estratto attraverso la dissociazione dei complessi DNA-proteine e successivamente purificato per separazione dalle macromolecole presenti (proteine, polisaccaridi, ecc.). Il DNA estratto secondo le istruzioni riportate nel kit, viene sottoposto ad amplificazione mediante PCR.

Amplificazione del DNA batterico mediante PCR

La PCR è una metodica attraverso cui, una sequenza di acido nucleico può essere amplificata esponenzialmente in vitro.

La reazione (Figura 2) consiste nell'alternanza di tre fasi, che vengono ripetute ciclicamente per un numero determinato di volte: **denaturazione** del DNA, attraverso la quale il template prescelto viene separato nei singoli filamenti; **annealing** o ibridazione dei *primer* oligonucleotidici che fungono da inneschi capaci di ibridarsi con le rispettive sequenze complementari presenti sui due filamenti; **polimerizzazione** o estensione del filamento stampo, catalizzata dall'enzima Taq-polimerasi che provoca l'allungamento degli inneschi aggiungendo nucleotidi alle catene.

La reazione viene completata da una fase di **estensione** finale, allo scopo di ottenere prodotti completi e consentire quindi una totale polimerizzazione di tutte le molecole iniziate.

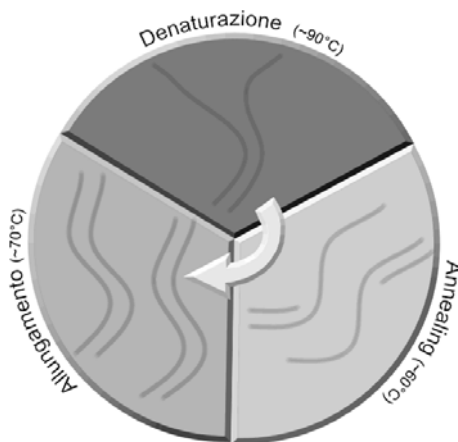


Figura 2. Un ciclo di PCR

Metodica di preparazione della miscela di reazione

Prelevare 1-5 µL di DNA totale batterico estratto e aggiungerlo alla miscela di reazione di amplificazione (volume finale 50 µL), composta come specificato nelle schede di ogni singolo microrganismo. Prima di aggiungere la *Taq polymerasi*, pretrattare la miscela a 99 °C per 10 min (tale trattamento può essere effettuato direttamente nel *Thermal Cycler*).

Dopo raffreddamento della miscela, aggiungere la *Taq polimerasi* e procedere con la reazione di amplificazione, che consiste di un numero di cicli, tempi e temperature ottimali specifici per ogni microrganismo (Tabella 2).

Tabella 2. Condizioni di PCR ottimali per ogni singolo microrganismo

Specie	Primer	Ciclo iniziale	Amplificazione			Cicli totali	Ciclo finale
			Denaturazione	Annealing	Estensione		
<i>B. coagulans</i>	Spo3+Spo4	95 °C x5min	95 °C x1min	65 °C x1min	72 °C x1min	30	72 °C x10min
<i>B. bifidum</i>	ldb21F+ldbc1R	96 °C x2min	94 °C x30s	63 °C x40s	72 °C x30s	35	72 °C x5min
<i>Bifidobacterium</i> spp	BibiF1+BibiF2	96 °C x2min	94 °C x30s	63 °C x40s	72 °C x30s	35	72 °C x5min
<i>L. acidophilus</i>	Acido+Lac	95 °C x5min	95 °C x1min	55 °C x1min	72 °C x1min	30	72 °C x7min
<i>L. acidophilus</i>	ldlc4F+ldl22R	94 °C x2min	94 °C x20s	51 °C x40s	68 °C x30s	35	68 °C x7min
<i>L. casei</i>	W1+Y2	94 °C x3min	50 °C x45s	72 °C x1min	94 °C x45s	45	72 °C x5min
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Ldel7+Lac2	95 °C x3min	94 °C x30s	58 °C x1min	72 °C x1min	35	72 °C x10min
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i>	Lb1+Llb1	94 °C x2min	94 °C x45s	58 °C x30s	72 °C x30s	35	72 °C x10min
<i>L. helveticus</i>	Tri f+Tri r	94 °C x2min	94 °C x45s	50 °C x45s	72 °C x1min	35	72 °C x7min
<i>L. kefir</i>	LK1+Lk2	95 °C x10min	95 °C x1min	50 °C x1min	72 °C x1min	35	72 °C x10min
<i>L. paracasei</i>	W2+Y2	94 °C x3min	50 °C x45s	72 °C x1min	94 °C x45s	45	72 °C x5min
<i>L. plantarum</i>	Plant+Lowlac	95 °C x10min	95 °C x30s	65 °C x30s	72 °C x1min	45	72 °C x10min
<i>L. reuteri</i>	Reut1+Lowlac	95 °C x10min	95 °C x30s	65 °C x30s	72 °C x1min	45	72 °C x10min
<i>L. rhamnosus</i>	W3+Y2	94 °C x3min	50 °C x45s	72 °C x1min	94 °C x45s	45	72 °C x5min
<i>L. salivarius</i>	Sal1+Lowlac	95 °C x10min	95 °C x30s	65 °C x30s	72 °C x1min	45	72 °C x10min
<i>Lc. lactis</i>	G1+L1	-	94 °C x1min	55 °C x2min	72 °C x3min	25	72 °C x10min
<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	PfFl+PrfII PfrI+PrfII	94 °C x2min	94 °C x30s	50 °C x30s	72 °C x30s	35	72 °C x10min
<i>S. thermophilus</i>	ThI+ThII	92 °C x2min	95 °C x30s	55 °C x30s	72 °C x30s	30	72 °C x5min

Per permettere di valutare la specificità della metodica, nell'allestimento di una reazione di PCR è necessario, insieme ai campioni da testare, allestire sempre un *controllo positivo* (DNA estratto dal ceppo di riferimento rappresentativo della specie in esame) (Tabella 3) e un *controllo negativo* (DNA estratto da un ceppo diverso dalla specie in esame), al fine di evidenziare la presenza di falsi positivi o falsi negativi¹.

Tabella 3. Ceppi di riferimento utilizzati *

Specie	Numero ATCC/DSM/NCDO ²
<i>Bacillus coagulans</i>	ATCC 7050
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC 35914
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 314
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 7830
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 15009
<i>Lactobacillus kefir</i>	ATCC 8007
<i>Lactobacillus paracasei</i>	NCDO 151 T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 39542
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSMZ 20016 T
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	ATCC 11741
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 11454
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	ATCC 9614
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 13419
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC 19258

* Possono essere ugualmente utilizzati ceppi appartenenti a collezioni internazionali diversi da quelli riportati in questa tabella.

Visualizzazione dell'amplificato mediante elettroforesi su gel d'agarosio

L'elettroforesi su gel d'agarosio permette la valutazione degli amplificati ottenuti dalla reazione di amplificazione, attraverso la migrazione delle molecole di DNA in funzione del peso molecolare e sotto l'influenza di un campo elettrico. La presenza del bromuro d'etidio³ nell'agarosio, permette la rilevazione dei campioni mediante lettura con un transilluminatore UV. In Tabella 4 vengono riportati i materiali necessari per l'allestimento di un'elettroforesi.

Tabella 4. Materiali necessari per la preparazione dell'elettroforesi e relativa concentrazione

Materiali	Concentrazione
Agarosio per biologia molecolare	--
Tampone per elettroforesi (TAE o altro equivalente)	10X
Soluzione colorante (Blu di bromofenolo o equivalente)	6X
Bromuro d'etidio	10 mg/mL
Marker molecolare 100 bp	--

¹ Si raccomanda di mantenere sempre in ghiaccio i campioni da analizzare e tutti i reagenti della reazione.

² ATCC = American Type Culture Collection.

DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

NCDO = National Collection of Dairy Organisms.

³ Colorante fluorescente intercalante tra le basi del DNA, che viene stimolato utilizzando luce ultravioletta a una lunghezza d'onda di 300nm.

Preparazione del gel d'agarosio

Preparare 1L di tampone TAE 1X dalla soluzione stock 10X (2M Tris-Acetate, 5mM EDTA-Na2 pH8) da utilizzare sia per la corsa elettroforetica che per la preparazione dell'agarosio all'1% (1g di agarosio in 100 mL di TAE 1X).

Dopo aver sciolto l'agarosio e fatto raffreddare a 50 °C in bagnomaria, aggiungere 6µL di bromuro d'etidio e versarlo nell'apposito supporto già predisposto con il *pettine* per creare i pozzetti; lasciare solidificare per 30-40 min. Dopo tale periodo e dopo aver estratto il pettine, il gel è pronto per essere inserito nella camera elettroforetica, per il caricamento dei campioni.

I campioni vengono preparati aggiungendo un colorante, il blu di bromo fenolo, che permette di seguire meglio la migrazione del campione nel gel e sottoposti alla corsa elettroforetica per 1-1,5 ore applicando una differenza di potenziale pari a 70-80V.

Visualizzare i risultati esponendo il gel ai raggi UV.

Lettura dei risultati

Per considerare **positivo** il riscontro dell'analisi per uno specifico microrganismo, devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

1. in corrispondenza del campione in esame è presente una banda delle dimensioni attese, paragonandola per dimensione a quella di un marcatore di peso molecolare noto;
2. la banda di interesse è allineata a quella del controllo positivo;
3. la banda corrispondente al controllo negativo è assente.

Per considerare **negativo** il riscontro dell'analisi per uno specifico microrganismo, devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

1. in corrispondenza del campione in esame è presente una banda di dimensioni diverse da quelle attese, o non è presente alcuna banda di amplificazione;
2. la banda attesa relativa al controllo positivo è presente;
3. la banda relativa al controllo negativo è assente.

Per considerare **non conforme** il riscontro dell'analisi per uno specifico microrganismo, si deve riscontrare una delle seguenti condizioni:

1. la banda relativa al controllo positivo è assente;
2. la banda relativa al controllo negativo è presente.

Metodi per l'identificazione genetica di microrganismi probiotici

1. *BACILLUS COAGULANS*

1.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Bacillus coagulans* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

1.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

1.3. Preparazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

1.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	0,5μM	0,5
Primer antisenso 100 μM	0,5μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Spo3: 5' TCT TGC GGC TCA ACC GCA AGC GG 3'	16S rRNA	720
Spo4: 5' TGC AGG CGG GTT GCA GCC TGC 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	95 °C x 5'	} (30 cicli)
Amplificazione	95 °C x 1'	
Annealing	65 °C x 1'	
Estensione	72 °C x 1'	
Estensione finale	72 °C x 10'	

1.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

2. *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

2.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Bifidobacterium bifidum* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

2.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA IS, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

2.3. Preparazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

2.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,75		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5		
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25		
Volume finale	----	50		

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Idb21F: 5' TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCT 3'	16S rRNA IS	1018
Idbc1R: 5' ATC CGA ACT GAG ACC GGT T 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	96 °C x 2'	} (35 cicli)
Amplificazione	94 °C x 30''	
Annealing	63 °C x 40''	
Estensione	72 °C x 30''	
Estensione finale	72 °C x 5'	

2.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

3. *BIFIDOBACTERIUM* SPP

3.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Bifidobacterium* spp mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

3.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA IS, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

3.3. Preparazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

3.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,75		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5		
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25		
Volume finale	----	50		

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
BibiF1: 5' CCA CAT GAT CGC ATG TGA TTG 3'	16S rRNA IS	278
BibiF2: 5' CCG AAG GCT TGC TCC CAA A 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	96 °C x 2'	} (35 cicli)
Amplificazione	94 °C x 30''	
Annealing	63 °C x 40''	
Estensione	72 °C x 30''	
Estensione finale	72 °C x 5'	

3.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

4. *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (primer Acido/Lac)

4.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus acidophilus* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

4.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

4.3. Preparazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

4.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione finale</i>	<i>Volume (μL)</i>
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Acido: 5'-TGA ACC AAC AGA TTC ACT TC-3'	16S rRNA	1000
Lac: 5'-TGA CGA CAG CCA TGC ACC A-3'		

Condizioni di PCR con primer acido e lac

Denaturazione	95 °C 5'	} (30 cicli)
Amplificazione	95 °C 1'	
Annealing	55 °C 1'	
Estensione	72 °C 1'	
Estensione finale	72 °C 7'	

4.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

5. *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (primer Idlc4F/Idl22R)

5.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus acidophilus* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

5.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA IS, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

5.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

5.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione finale</i>	<i>Volume (μL)</i>
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	0,5μM	0,5
Primer antisenso μM	0,5μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Idlc4F: 5'-AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC- 3'	16S-23S IS	606
Idl22R: 5'-AACTATCGCTTACGCTACCACTTTGC- 3'		

<i>Condizioni di PCR con primer Idlc4f + Idl22r</i>		
Denaturazione	94 °C x 2'	} (35 cicli)
Amplificazione	94 °C x 20''	
Annealing	51 °C x 40''	
Estensione	68 °C x 30''	
Estensione finale	68 °C x 7'	

5.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

6. *LACTOBACILLUS CASEI*

6.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus casei* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

6.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

6.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

6.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione finale</i>	<i>Volume (μL)</i>
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	0,5 μM	0,5
Primer antisense 100 μM	0,5 μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
W1: 5'-TGC ACT GAG ATT CGA CTT AA-3'	16S rRNA	295
Y2: 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	94 °C x 3'	} (45 cicli)
Amplificazione	50 °C x 45''	
Annealing	72 °C x 1'	
Estensione	94 °C x 45''	
Estensione finale	72 °C x 5'	

6.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

7. *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *BULGARICUS*

7.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

7.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

7.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

7.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,70		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5		
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,3		
Volume finale	----	50		

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Ldel7: 5' ACA GAT GGA TGG AGA GCA GA 3''	16S rRNA	450
Lac2: 5' CCT CTT CGC TCG CCG CTA CT 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	95 °C x 3'	} (35 cicli)
Amplificazione	94 °C x 30''	
Annealing	58 °C x 1'	
Estensione	72 °C x 1'	
Estensione finale	72 °C x 10'	

7.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

8. *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *LACTIS*

8.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

8.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del gene per la prolina-iminopeptidasi (*pepIP*), attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

8.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

8.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,70		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
<i>Primer</i> senso 100 μM	1 μM	0,5		
<i>Primer</i> antisenso 100 μM	1 μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,3		
Volume finale	----	50		
<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>		
Lb1: 5' AAA AAT GAA GTT GTT TAA AGT AGG TA 3'	pepIP	1600		
Lb1: 5' AAG TCT GTC CTC TGG CTG G 3'				

Condizioni di PCR

Denaturazione	94 °C x 2'	} (35 cicli)
Amplificazione	94 °C x 45''	
<i>Annealing</i>	58 °C x 30''	
Estensione	72 °C x 30''	
Estensione finale	72 °C x 10'	

8.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

9. *LACTOBACILLUS HELVETICUS*

9.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus helveticus* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

9.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del gene per la serina-proteasi trypsin-like (*htrA*), attraverso l'utilizzo di primer specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

9.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

9.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,75		
Buffer 10X	1 X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5		
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25		
Volume finale	----	50		

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Tri f: 5' TCT TAT TAC GCA ATG GAC CAA 3'	<i>htrA</i>	918
Tri r: 5' AAT ACC GTT CTT GAG GTT AGA 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	94 °C x 2'	} (35 cicli)
Amplificazione	94 °C x 45''	
Annealing	50 °C x 45''	
Estensione	72 °C x 1'	
Estensione finale	72 °C x 7'	

9.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

10. LACTOBACILLUS KEFIRI

10.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus kefir* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

10.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del gene per la subunità α della RNA polymerase (*rpoA*), attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

10.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

10.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,75		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μ M	1 μ M	0,5		
Primer antisenso 100 μ M	1 μ M	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/ μ L	1,25U	0,25		
Volume finale	----	50		

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
LK1: 5'CAA CAA TCA AAG GGG TTG TTG 3'	<i>rpoA</i>	500
Lk2: 5'TCA CTA GGA GTA ATT GAA CCA 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	95 °C x 10'	} (35 cicli)
Amplificazione	95 °C x 1'	
Annealing	50 °C x 1'	
Estensione	72 °C x 1'	
Estensione finale	72 °C x 10'	

10.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

11. *LACTOBACILLUS PARACASEI*

11.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus paracasei* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

11.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

11.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

11.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione finale</i>	<i>Volume (μL)</i>
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	0,5 μM	0,5
Primer antisenso 100 μM	0,5 μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
W2: 5'-CCGAGATTCAACATGG-3'	16S rRNA	295
Y2: 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	94 °C x 3'	} (45 cicli)
Amplificazione	50 °C x 45''	
Annealing	72 °C x 1'	
Estensione	94 °C x 45''	
Estensione finale	72 °C x 5'	

11.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

12. LACTOBACILLUS PLANTARUM

12.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus plantarum* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

12.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

12.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

12.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione finale</i>	<i>Volume (μL)</i>
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	1μM	0,5
Primer antisenso 100 μM	1μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Plant: 5' ATC ATG ATT TAC ATT TGA GTG 3'	16S rRNA	996
Lowlac: 5' CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	95 °C x 10'	} (45 cicli)
Amplificazione	95 °C x 30''	
Annealing	65 °C x 30''	
Estensione	72 °C x 1'	
Estensione finale	72 °C x 10'	

12.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

13. LACTOBACILLUS REUTERI

13.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus reuteri* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

13.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

13.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

13.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

Reagenti di PCR	Concentrazione	Volume (μL)
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

Sigla e sequenza dei primer	Target	Dim. prod. (bp)
Reut1: 5' TGA ATT GAC GAT GGA TCA CCA GTG 3'	16S rRNA	1000
Lowlac: 5' CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT 3'		

Condizioni di PCR		
Denaturazione	95 °C x 10'	} (45 cicli)
Amplificazione	95 °C x 30''	
Annealing	65 °C x 30''	
Estensione	72 °C x 1'	
Estensione finale	72 °C x 10'	

13.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

14. LACTOBACILLUS RHAMNOSUS

14.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus rhamnosus* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

14.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

14.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

14.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

Reagenti di PCR	Concentrazione finale	Volume (μL)
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	0,5 μM	0,5
Primer antisenso 100 μM	0,5 μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

Sigla e sequenza dei primer	Target	Dim. prod. (bp)
W3: 5'-TGC ATC TTG ATT TAA TTT TG-3'	16S rRNA	295
Y2: 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'		

Condizioni di PCR		
Denaturazione	94 °C x 3'	} (45 cicli)
Amplificazione	50 °C x 45''	
Annealing	72 °C x 1'	
Estensione	94 °C x 45''	
Estensione finale	72 °C x 5'	

14.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

15. *LACTOBACILLUS SALIVARIUS*

15.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactobacillus salivarius* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

15.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S rRNA, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

15.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

15.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,75		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μM	1μM	0,5		
Primer antisenso 100 μM	1μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25		
Volume finale	----	50		
<i>Sigla e sequenza dei primer</i>			<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
Sal1: 5' ATT CAC TCG TAA GAA GT 3'			16S rRNA	993
Lowlac: 5' CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT 3'				
<i>Condizioni di PCR</i>				
Denaturazione	95 °C x 10'	} (45 cicli)		
Amplificazione	95 °C x 30''			
Annealing	65 °C x 30''			
Estensione	72 °C x 1'			
Estensione finale	72 °C x 10'			

15.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

16. LACTOCOCCUS LACTIS

16.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Lactococcus lactis* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

16.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S-23S rRNA *intergenic spacer*, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

16.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

16.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>
H ₂ O distillata sterile	----	35,75
Buffer 10X	1X	5
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4
Primer senso 100 μM	1μM	0,5
Primer antisenso 100 μM	1μM	0,5
DNA	----	1
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25
Volume finale	----	50

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
G1: 5' GAA GTC GTA ACA AGG 3'	16S-23S IS	380
L1: 5' CAA GGC ATC CAC CGT 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Amplificazione	94 °C x 1'	} (25 cicli)
Annealing	55 °C x 2'	
Estensione	72 °C x 3'	
Estensione finale	72 °C x 10'	

16.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

17. *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* SUBSP. *SHERMANII*

17.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

17.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S-23S rRNA IS attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

17.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

17.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

Reagenti di PCR	Concentrazione	Volume (μL)		
H ₂ O distillata sterile	----	35,75		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5		
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25		
Volume finale	----	50		

Sigla e sequenza dei primer ⁴	Target	Dim. prod. (bp)
PfII: 5' GTA CTG CTG GTG CCC TG 3' PrfII: 5'TAG CTT GCT ACA CAA AAC TC 3'	16S-23S rRNA IS	241
PfI: 5'AGG AGC CTT TTC GCC ATC 3' PrfI: 5'TAG CTT GCT ACA CAA AAC TC 3'	16S-23S IS	346

Condizioni di PCR		
Denaturazione	94 °C x 2'	} (35 cicli)
Amplificazione	94 °C x 30''	
Annealing	50 °C x 30''	
Estensione	72 °C x 30''	
Estensione finale	72 °C x 10'	

17.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

⁴ I primer PfI e PfII non distinguono le due sottospecie *freudenreichii* e *shermanii*. La coppia di primer PfI e PfII riconoscono la sottospecie *freudenreichii*. Un prodotto positivo con i primer PfI e PfII e un prodotto negativo con i primer PfI e PfII identificano la sottospecie *shermanii*.

18. *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

18.1. Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per l'identificazione genetica di *Streptococcus thermophilus* mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA (tecnica della PCR).

18.2. Principio del metodo

Amplificazione genica di sequenze del 16S-23S rRNA *intergenic spacer*, attraverso l'utilizzo di *primer* specifici per il riconoscimento di specie e/o sottospecie.

18.3. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, vedere quanto riportato al paragrafo "Estrazione diretta del DNA totale dal prodotto" a pagina 11.

18.4. Allestimento ed esecuzione della reazione di PCR

Comportarsi secondo quanto descritto al paragrafo "Metodica di preparazione della miscela di reazione" a pagina 11 adottando le seguenti condizioni specifiche:

<i>Reagenti di PCR</i>	<i>Concentrazione</i>	<i>Volume (μL)</i>		
H ₂ O distillata sterile	----	35,75		
Buffer 10X	1X	5		
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	3		
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	4		
Primer senso 100 μM	1 μM	0,5		
Primer antisenso 100 μM	1 μM	0,5		
DNA	----	1		
Taq DNA polymerase 5 U/μL	1,25U	0,25		
Volume finale	----	50		

<i>Sigla e sequenza dei primer</i>	<i>Target</i>	<i>Dim. prod. (bp)</i>
ThI: 5' ACG GAA TGT ACT TGA GTT TC 3'	16S-23S IS	600
ThII: 5' TTT GGC CTT TCG ACC TAA C 3'		

<i>Condizioni di PCR</i>		
Denaturazione	92 °C x 2'	} (30 cicli)
Amplificazione	95 °C x 30''	
Annealing	55 °C x 30''	
Estensione	72 °C x 30''	
Estensione finale	72 °C x 5'	

18.5. Lettura dei risultati

Riferirsi a quanto riportato nell'ultimo paragrafo di pagina 14.

NUMERAZIONE DIFFERENZIALE PRESUNTIVA DELLE SPECIE MICROBICHE PROBIOTICHE VIVE DICHIARATE IN ETICHETTA

Introduzione

Per valutare il numero dei microrganismi vivi relativo alle specie microbiche dichiarate in etichetta, pur consapevoli dell'esistenza di una diversa vitalità tra i vari componenti di una popolazione microbica, si è ritenuto opportuno dare la preferenza a metodi basati sul conteggio delle colonie in un terreno agarizzato, dopo opportuna rivivificazione e incubazione, partendo dal presupposto che ogni cellula viva dia luogo ad una popolazione (colonia).

A tal fine vengono di seguito descritte metodiche di numerazione standardizzate e/o specifiche per ciascun genere dei seguenti microrganismi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium* e strategie di coltivazione finalizzate alla numerazione differenziale di specie diverse nell'ambito non solo di una popolazione mista di generi diversi, ma anche di specie diverse appartenenti allo stesso genere. Più precisamente, si propone l'utilizzo di particolari accorgimenti che sfruttano le caratteristiche fisiologiche proprie di una data specie batterica, quali la capacità di crescere a temperature diverse, la capacità di metabolizzare particolari substrati, la capacità di produrre colonie facilmente distinguibili su determinati terreni selettivi per la presenza di sostanze come gli antibiotici (29).

La composizione e le modalità di preparazione dei terreni selettivi per ciascun microrganismo considerato, sono riportati nell'appendice 1.

È opportuno effettuare la ricerca dei microrganismi patogeni *Salmonella* spp (30) e *Listeria monocytogenes* (31, 32), in quanto inseriti tra i criteri microbiologici per la valutazione della sicurezza degli alimenti (33).

Sia i metodi microbiologici per la ricerca e numerazione di microrganismi probiotici, che quelli per la ricerca dei microrganismi patogeni sono stati opportunamente verificati e validati secondo quanto previsto dalla norma ISO 17025 (12).

Preparazione della diluizione iniziale e rivivificazione

Come già ricordato, gli integratori alimentari a base di probiotici generalmente si presentano sotto le seguenti forme commerciali: capsule, compresse, bustine, tavolette masticabili, flaconcini.

Nel caso dei flaconcini con tappo dosatore prelevare solo il contenuto del tappo dosatore; nel caso delle capsule prelevare solo il contenuto dell'involucro costituente la capsula stessa. Nel caso delle compresse ridurre in polvere mediante mortaio e pestello sterili.

Sospendere la porzione di unità campionaria da sottoporre ad analisi e addizionarla dell'opportuna quantità di diluente in modo da ottenere la diluizione 1:10 (sospensione iniziale), lasciare riposare a temperatura ambiente per 45' (34) per favorire la rivivificazione e allestire le diluizioni decimali successive.

Al fine di evitare qualunque influenza negativa sui batteri anaerobi stretti, portare ad ebollizione al momento dell'analisi il diluente e mantenerlo in questo stato per almeno 10 min; lasciar raffreddare prima del suo utilizzo e impiegare nel più breve tempo possibile, possibilmente in condizione di anaerobiosi.

Procedere alla semina nei terreni selettivi idonei, di seguito specificati per ogni microrganismo da ricercare.

Procedura di conteggio mediante tecnica della semina in superficie (*spreading-spatula method*)

Si suggerisce di utilizzare la tecnica della semina in superficie in quanto risulteranno facilitate l'osservazione della morfologia delle colonie e il loro prelievo per le successive fasi di identificazione.

Trasferire sterilmente 0,1mL della sospensione iniziale sulla superficie dei terreni selettivi, solidificate in piastre di Petri. Ripetere l'operazione con ogni diluizione decimale. Mediante l'uso di spatole sterili distribuire uniformemente l'inoculo sulla superficie dell'agar, evitando di toccare i bordi della piastra.

Lasciare le piastre a temperatura ambiente per circa 15 minuti per permettere all'inoculo di assorbirsi e incubarle per il tempo, la temperatura e le concentrazione di ossigeno specifiche per il microrganismo considerato.

Per le preparazioni contenenti anaerobi stretti eseguire tutte le operazioni analitiche sotto una cappa per anaerobiosi.

Numero di piastre di Petri per ogni diluizione

Nel caso dei laboratori che operano in qualità, secondo i principi della norma ISO 17025 (12), seminare una singola piastra di Petri per ogni diluizione. Nel caso di un laboratorio che non opera in qualità utilizzare due piastre di Petri per diluizione (35).

Numerazione delle colonie

In presenza di una popolazione mista (indicazione in etichetta di più specie), la conta delle colonie va effettuata sia prima che dopo l'identificazione della specie (test di conferma).

Per la numerazione presuntiva considerare separatamente tutte le colonie con caratteristiche morfologiche simili.

Numerazione delle colonie prima dell'identificazione

Procedere al calcolo del numero (N) di microrganismi presenti nell'aliquota analizzata, calcolando la media ponderata tra le due diluizioni successive prese in considerazione, in base alla seguente formula (35):

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

Dove:

ΣC è la somma delle colonie ottenute dalla conta delle piastre relative alle due diluizioni successive prese in considerazione, e di cui almeno una contiene 10 colonie;

V è il volume, espresso in millilitri, dell'inoculo seminato in ogni piastra;

d è la diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata.

Esempio:

Prima diluizione considerata: 10^{-2} ,
 numero di colonie contate alla diluizione $10^{-2} = 116$

Seconda diluizione considerata: 10^{-3}
 Numero di colonie contate alla diluizione $10^{-3} = 24$

Volume dell'inoculo: 0,1mL

Prima diluizione considerata: 10^{-2}

Calcolo:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{116 + 24}{0,1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{140}{0,0011} = 127272,7$$

Arrotondando il risultato, il numero di microrganismi sarà 130000 o $1,3 \times 10^5$ per grammo o millilitro di prodotto.

Espressione dei risultati nel caso di assenza di crescita batterica

In caso di assenza di crescita batterica riportare il risultato come segue: *meno di 1/d microrganismi per millilitro o per grammo di prodotto analizzato*, dove *d* è il fattore di diluizione della sospensione iniziale o della prima diluizione inoculata.

Metodi per la numerazione dei microrganismi probiotici

19. GENERE *BACILLUS*

19.1. Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione presuntiva di Bacilli sporigeni mediante conteggio delle colonie dopo incubazione in aerobiosi a 37 °C su terreno solido (36).

19.2. Principio del metodo

Semina per spatolamento sulla superficie di un terreno solido [Tryptone Soya Agar (TSA)] di 0,1mL del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 37 °C per 24h.

19.3. Terreni di coltura e diluenti

Maximum recovery diluent (MRD)
Tryptone Soya Agar (TSA)

19.4. Procedimento

Prelevare asetticamente un'opportuna quantità del campione da esaminare e diluirla in rapporto 1:10 (sospensione iniziale) in MRD. Omogeneizzare opportunamente.

Trasferire asetticamente 5mL della sospensione così ottenuta in una provetta sterile e riscaldare in bagno termostato a 80 °C per 10 minuti. Raffreddare ed eseguire diluizioni decimali fino a quella ritenuta utile per un adeguato conteggio.

Con una pipetta sterile, trasferire in ogni piastra di TSA 0,1mL della sospensione iniziale (diluizione 1:10) o 0,1mL del campione in esame, se liquido. Ripetere la procedura per le diluizioni successive. Utilizzando una spatola sterile, (una per ogni diluizione), distribuire con attenzione l'inoculo sulla superficie dell'agar il più rapidamente possibile, cercando di non toccare i bordi della piastra.

19.5. Incubazione

Incubare le piastre in aerobiosi a 37 °C per 24h.

19.6. Conta presuntiva delle colonie

Procedere al conteggio di tutte le diverse tipologie di colonie sviluppatesi come riportato al paragrafo "Numerazione delle colonie prima dell'identificazione" a pagina 36. Annotare i risultati.

19.6.1. Identificazione delle colonie presuntive

Subcolturare nello stesso terreno agarizzato utilizzato per il conteggio tutte le colonie selezionate. Effettuare in doppio ogni subcoltura in modo tale da poterne congelare una a -80 °C in *microbank*, e utilizzare l'altra per le ulteriori determinazioni analitiche.

- a) esame microscopico previa colorazione del Gram.
- b) identificazione fenotipica mediante la determinazione del profilo biochimico, utilizzando sistemi miniaturizzati di identificazione: API 50 CHB (Biomérieux o equivalenti), seguendo le istruzioni del produttore.

20. GENERE *BIFIDOBACTERIUM*

20.1. Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione e l'identificazione presuntiva di microrganismi appartenenti al genere *Bifidobacterium* mediante conteggio delle colonie dopo incubazione in anaerobiosi a 37 °C su terreno solido (37).

20.2. Principio del metodo

Semina per spatolamento sulla superficie di un terreno solido selettivo della sospensione iniziale (o di 0,1mL del campione in esame se liquido) e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 37 °C per 3gg in anaerobiosi.

20.3. Terreni di coltura e diluenti

Maximum recovery diluent (MRD)

HHD agar

MRS agar + 0,05% L-cisteina HCl (29)

20.4. Procedimento

Prelevare asetticamente un'opportuna quantità del campione da esaminare e diluirla in rapporto 1:10 (sospensione iniziale) in MRD. Omogeneizzare opportunamente.

Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino a quella ritenuta utile per un adeguato conteggio.

Con una pipetta sterile, trasferire in ogni piastra di HHD agar[e/o MRS agar + 0,05% L-cisteina HCl] 0,1mL della sospensione iniziale (diluizione 1:10) o 0,1mL del campione in esame, se liquido. Ripetere la procedura per le diluizioni successive. Utilizzando una spatola sterile, (una per ogni diluizione), distribuire con attenzione l'inoculo sulla superficie dell'agar il più rapidamente possibile, cercando di non toccare i bordi della piastra.

20.5. Incubazione

Incubare le piastre in anaerobiosi a 37 °C per 48-72h.

20.6. Conta presuntiva delle colonie

Procedere al conteggio di tutte le diverse tipologie di colonie sviluppatesi come riportato al paragrafo "Numerazione delle colonie prima dell'identificazione" a pagina 36. In particolare su HHD agar procedere al conteggio delle colonie tipiche di bifidobatteri che appaiono bianche trasparenti come piccole gocce d'acqua (Bianchi Salvadori, comunicazione personale). Annotare i risultati.

20.6.1. Identificazione delle colonie presuntive

Subcolturare nello stesso terreno agarizzato utilizzato per il conteggio tutte le colonie selezionate. Effettuare in doppio ogni subcoltura in modo tale da poterne congelare una a -80 °C in *microbank*, e utilizzare l'altra per le ulteriori determinazioni analitiche.

Procedere come segue:

- a) esame microscopico previa colorazione del Gram
- b) identificazione fenotipica mediante la determinazione del profilo biochimico, utilizzando sistemi miniaturizzati di identificazione: API rapid ID 32A (Biomerieux o equivalenti), seguendo le istruzioni del produttore.

21. GENERE *LACTOBACILLUS*

21.1. Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione presuntiva di microrganismi vivi appartenenti al genere *Lactobacillus* mediante conteggio delle colonie dopo incubazione in anaerobiosi 37 °C su terreno solido (38-40).

21.2. Principio del metodo

Semina per spatolamento sulla superficie di un terreno solido selettivo (MRS agar) di 0,1mL della sospensione iniziale e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 37 °C per 3gg.

21.3. Terreni di coltura e diluenti

- *Maximum recovery diluent* (MRD)
- MRS agar acidificato

Tenere presente che non tutti i lattobacilli crescono su MRS agar acidificato e alcuni crescono lentamente, in questi casi è opportuno utilizzare l'MRS agar non acidificato.

21.4. Procedimento

Prelevare asetticamente un'opportuna quantità del campione da esaminare e diluirla in rapporto 1:10 (sospensione iniziale) in MRD. Omogeneizzare opportunamente in stomacher .

Eseguire ulteriori diluizioni decimali con lo stesso diluente fino a quella ritenuta utile per un adeguato conteggio. Trasferire sterilmente in ogni piastra di MRS agar 0,1mL della sospensione iniziale (diluizione 1:10) o 0,1mL del campione in esame, se liquido. Ripetere la procedura per le diluizioni decimali successive. Utilizzando una spatola sterile, (una per ogni diluizione), distribuire con attenzione l'inoculo sulla superficie dell'agar il più rapidamente possibile, cercando di non toccare i bordi della piastra.

21.5. Incubazione

Incubare a 37 °C in anaerobiosi per 72 ore.

Nel caso in cui in uno stesso campione siano presenti sia *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* che *Lactobacillus acidophilus*, è consigliabile incubare in anaerobiosi a 45 °C il primo, e in aerobiosi a 37 °C il secondo (41).

21.6. Conta presuntiva delle colonie

Procedere al conteggio di tutte le diverse tipologie di colonie sviluppatesi come riportato al paragrafo “Numerazione delle colonie prima dell'identificazione” a pagina 36. Annotare i risultati.

21.6.1. Identificazione delle colonie presuntive

Subcolturare nello stesso terreno agarizzato utilizzato per il conteggio tutte le colonie selezionate. Effettuare in doppio ogni subcoltura in modo tale da poterne congelare una a -80 °C in *microbank*, e utilizzare l'altra per le ulteriori determinazioni analitiche.

Procedere come segue:

- a) esame microscopico previa colorazione del Gram.
- b) identificazione fenotipica mediante la determinazione del profilo biochimico, utilizzando sistemi miniaturizzati di identificazione: API 50 CHL (Biomérieux o equivalenti), seguendo le istruzioni del produttore.

21.7. Colture miste

Per i prodotti contenenti più specie appartenenti al genere *Lactobacillus* è necessario utilizzare particolari strategie colturali per renderne più agevole la differenziazione. In questo caso è opportuno affiancare alla numerazione presuntiva sopra descritta, quella ottenuta sfruttando le caratteristiche proprie di una data specie batterica, quali, ad esempio, la capacità di crescere a temperature diverse da quella ottimale; la capacità di metabolizzare particolari substrati, la capacità di produrre colonie facilmente distinguibili, sul terreno colturale di base modificato con l'aggiunta di specifiche sostanze, o su terreni selettivi (Tabella 6). In particolare, si può utilizzare:

- MRS agar con l'aggiunta di vancomicina per selezionare la crescita dei lattobacilli etero fermentanti. (2ml di una soluzione contenente 0,05g di vancomicina /100ml aggiunti ad 1litro di terreno; concentrazione finale: 1mg/litro) (29);
- MRS agar con l'aggiunta di L-cisteina/HCl (concentrazione finale: 0,05%) e di blu di bromo fenolo (concentrazione finale: 0,002%) per ottenere colonie facilmente distinguibili per morfologia, taglia e colore (42);
- HHD agar per differenziare i lattobacilli omofermentanti (il glucosio è fermentato esclusivamente in acido lattico) da quelli eterofermentanti (il glucosio è fermentato in acido lattico, CO₂, etanolo e/o acido acetico) (37, 43).

Tabella 6. Condizioni di coltura differenziali di specie appartenenti al genere *Lactobacillus*

Microorganismi*	MRS agar + vancomicina incubato a 37 °C per 72h in anaerobiosi	MRS agar + blu di bromofenolo incubato a 37 °C per 48 h in anaerobiosi	MRS agar incubato a 15 °C	MRS agar incubato a 30 °C in anaerobiosi	MRS agar incubato a 45 °C	MRS agar incubato a 52 °C	HHD incubato a 37 °C per 48-72 h in anaerobiosi
<i>L. acidophilus</i>	/	colonie piatte dai margini irregolari	assenza di crescita	/	/	/	colonie blu con alone bianco
<i>L. bulgaricus</i>	/	colonie dai margini irregolari	/	/	/	assenza di crescita	colonie blu
<i>L. casei</i>	crescita [§] ^	/	crescita [§]	/	assenza di crescita	/	colonie bianche
<i>L. helveticus</i>	/	/	assenza di crescita	/	crescita [§]	crescita [§]	colonie di colore variabile dal blu al verde
<i>L. kefir</i>	crescita [§]	/	/	crescita [§]	/	/	colonie bianche
<i>L. lactis</i>	/	/	/	/	/	crescita [§]	colonie di colore variabile dal blu al verde
<i>L. paracasei</i>	crescita [§]	piccole colonie bluastre dai margini regolari	/	/	/	/	colonie bianche
<i>L. plantarum</i>	crescita [§]	colonie con centro blu scuro e dai margini regolari	crescita [§]	crescita [§]	assenza di crescita	/	colonie bianche
<i>L. rhamnosus</i>	crescita [§] ^	/	crescita [§]	/	crescita [§]	/	colonie bianche
<i>L. reuteri</i>	crescita [§]	colonie dai margini irregolari	assenza di crescita	/	crescita [§]	/	colonie bianche
<i>L. salivarius</i>	/	/	/	/	/	/	colonie di colore variabile dal blu al verde

* specie più frequentemente incontrate nelle preparazioni

§ colonie di colore variabile dal bianco al crema

^ nel caso in cui in uno stesso campione siano presenti entrambi questi microrganismi, per determinare il numero di *L. casei*, si procede sottraendo il numero di *L. rhamnosus* ottenuto dopo incubazione a 43 °C per 72 h in anaerobiosi dalla conta microbica totale (*L. casei* e *L. rhamnosus*) ottenuta dopo incubazione a 37 °C per 72 h in anaerobiosi

22. GENERE *LACTOCOCCUS*

22.1. Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione presuntiva di microrganismi appartenenti al genere *Lactococcus* mediante conteggio delle colonie dopo incubazione in aerobiosi a 30 °C su terreno solido (41).

22.2. Principio del metodo

Semina per spatolamento sulla superficie di un terreno solido selettivo (M17 agar) di 0,1mL della sospensione iniziale (o di 0,1mL del campione in esame se liquido) e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 30 °C per 72h.

22.3. Terreni di coltura e diluenti

Maximum recovery diluent (MRD)
M17 agar

22.4. Procedimento

Prelevare asepticamente un'opportuna quantità del campione da esaminare e diluirla in rapporto 1:10 (sospensione iniziale) in MRD. Omogeneizzare opportunamente. Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino a quella ritenuta utile per un adeguato conteggio.

Con una pipetta sterile, trasferire in ogni piastra di M17 agar 0,1mL della sospensione iniziale (diluizione 1:10) o 0,1mL del campione in esame, se liquido. Ripetere la procedura per le diluizioni successive. Utilizzando una spatola sterile, (una per ogni diluizione), distribuire con attenzione l'inoculo sulla superficie dell'agar il più rapidamente possibile, cercando di non toccare i bordi della piastra.

22.5. Incubazione

Incubare le piastre in aerobiosi a 30 °C per 72h.

22.6. Conta presuntiva delle colonie

Procedere al conteggio di tutte le diverse tipologie di colonie sviluppatesi come riportato al paragrafo "Numerazione delle colonie prima dell'identificazione" a pagina 36. Annotare i risultati.

22.6.1. Identificazione delle colonie presuntive

Subcolturare nello stesso terreno agarizzato utilizzato per il conteggio tutte le colonie selezionate. Effettuare in doppio ogni subcoltura in modo tale da poterne congelare una a -80 °C in *microbank*, e utilizzare l'altra per le ulteriori determinazioni analitiche.

Procedere come segue:

- a) esame microscopico previa colorazione del Gram.
- b) identificazione fenotipica mediante la determinazione del profilo biochimico, utilizzando sistemi miniaturizzati di identificazione: API 50 CHL (Biomérieux o equivalenti), seguendo le istruzioni del produttore.

23. GENERE *PROPIONIBACTERIUM*

23.1. Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione e l'identificazione presuntiva di microrganismi appartenenti al genere *Propionibacterium* mediante conteggio delle colonie dopo incubazione in aerobiosi 30 °C su terreno solido (29, 44).

23.2. Principio del metodo

Semina per spatolamento sulla superficie di un terreno solido non selettivo (*Propionibacterium isolation medium*) della sospensione iniziale (o di 0,1mL del campione in esame se liquido) e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 30 °C per 8-9gg.

23.3. Terreni di coltura e diluenti

Maximum recovery diluent (MRD)

Propionibacterium isolation medium

23.4. Procedimento

Prelevare asepticamente un'opportuna quantità del campione da esaminare e diluirla in rapporto 1:10 (sospensione iniziale) in MRD. Omogeneizzare opportunamente.

Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino a quella ritenuta utile per un adeguato conteggio.

Con una pipetta sterile, trasferire in ogni piastra di *Propionibacterium isolation medium* 0,1mL della sospensione iniziale (diluizione 1:10) o 0,1mL del campione in esame, se liquido. Ripetere la procedura per le diluizioni successive. Utilizzando una spatola sterile, (una per ogni diluizione), distribuire con attenzione l'inoculo sulla superficie dell'agar il più rapidamente possibile, cercando di non toccare i bordi della piastra.

23.5. Incubazione

Incubare le piastre a 30 °C in anaerobiosi per 8-9gg.

23.6. Conta presuntiva delle colonie

Procedere al conteggio di tutte le diverse tipologie di colonie sviluppatesi come riportato al paragrafo "Numerazione delle colonie prima dell'identificazione" a pagina 36. Annotare i risultati.

23.6.1. Identificazione delle colonie presuntive

Subcolturare nello stesso terreno agarizzato utilizzato per il conteggio tutte le colonie selezionate. Effettuare in doppio ogni subcoltura in modo tale da poterne congelare una a -80 °C in *microbank*, e utilizzare l'altra per le ulteriori determinazioni analitiche.

Procedere come segue:

- a) esame microscopico previa colorazione del Gram.
- b) identificazione fenotipica mediante la determinazione del profilo biochimico, utilizzando sistemi miniaturizzati di identificazione: API rapid ID 32A (Biomérieux o equivalenti), seguendo le istruzioni del produttore.

24. GENERE *STREPTOCOCCUS*

24.1. Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione e l'identificazione presuntiva di *Streptococcus thermophilus* mediante conteggio delle colonie dopo incubazione in aerobiosi a 37 °C su terreno solido (45, 46).

24.2. Principio del metodo

Semina per spatolamento sulla superficie di un terreno solido selettivo (M17 agar) di 0,1mL della sospensione iniziale (o 0,1mL del campione in esame se liquido) e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 37 °C per 48h.

24.3. Terreni di coltura e diluenti

Maximum recovery diluent (MRD)

M17 agar

HHD agar (37)

24.4. Procedimento

Prelevare asetticamente un'opportuna aliquota del campione da esaminare e diluirla in rapporto 1:10 (sospensione iniziale) in MRD/[è possibile utilizzare in alternativa HHD in cui il microorganismo forma colonie blu]. Omogeneizzare opportunamente.

Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino a quella ritenuta utile per un adeguato conteggio.

Con una pipetta sterile, trasferire in ogni piastra di M17 agar 0,1mL della sospensione iniziale (diluizione 1:10) o 0,1mL del campione in esame, se liquido. Ripetere la procedura per le diluizioni successive. Utilizzando una spatola sterile, (una per ogni diluizione), distribuire con attenzione l'inoculo sulla superficie dell'agar il più rapidamente possibile, cercando di non toccare i bordi della piastra.

24.5. Incubazione

Incubare le piastre in aerobiosi a 37 °C per 48h.

Nel caso in cui in uno stesso campione fossero presenti *S. thermophilus* e batteri appartenenti al genere *Lactococcus*, è consigliabile incubare l'M17 agar a 45 °C.

24.6. Conta presuntiva delle colonie

Procedere al conteggio di tutte le diverse tipologie di colonie sviluppatesi come riportato al paragrafo "Numerazione delle colonie prima dell'identificazione" a pagina 36. Annotare i risultati.

24.6.1. Identificazione delle colonie presuntive

Subcolturare nello stesso terreno agarizzato utilizzato per il conteggio tutte le colonie selezionate. Effettuare in doppio ogni subcoltura in modo tale da poterne congelare una a -80 °C in *microbank*, e utilizzare l'altra per le ulteriori determinazioni analitiche.

Procedere come segue:

- a) esame microscopico previa colorazione del Gram;
- b) identificazione fenotipica mediante la determinazione del profilo biochimico, utilizzando sistemi miniaturizzati di identificazione: API 50 CHL (Biomérieux o equivalenti), seguendo le istruzioni del produttore.

CONFERMA GENETICA DI SPECIE

Introduzione

La corretta identificazione delle specie dei batteri utilizzati a scopo probiotico è un pre-requisito fondamentale per la loro sicurezza d'uso e funzionalità.

A tale scopo, seguendo le indicazioni delle linee guida ministeriali, per l'identificazione genetica delle specie, si è proceduto ad un approccio polifasico o combinato, nel quale cioè l'identificazione fenotipica è stata integrata da un metodo molecolare, basato sullo studio del DNA.

Preparazione del DNA da coltura batterica

- Preparare una coltura batterica del microrganismo da analizzare in terreno agarizzato specifico e incubare le piastre alla temperatura e per il tempo previsti dal metodo per il microrganismo in esame.
- Prelevare una colonia ben isolata e risospenderla in 9 mL dello specifico brodo di crescita⁵.
- Incubare le provette alla temperatura e per il tempo previsti per il microrganismo studiato.
- Centrifugare 1 mL di brodocoltura a 5000 rpm per 10 min a 4 °C.
- Lavare il pellet per due volte con 1 mL di TAE 1X centrifugando dopo ogni lavaggio a 12000 rpm per 3 min a 4 °C e scartando ogni volta il surnatante.
- Risospendere il pellet in 1 mL di H₂O distillata sterile.
- Sottoporre i campioni a sonicazione (con una frequenza pari a 500 kHz) per 10 min, per facilitare la rottura della parete cellulare durante il successivo trattamento termico per 10 min a 99 °C⁶.

Il DNA è ora pronto per essere amplificato o congelato a -20 °C fino al momento dell'utilizzo (Figura 3).

Procedere con l'amplificazione secondo quanto riportato nella sezione "Metodi per l'identificazione genetica di microrganismi probiotici".

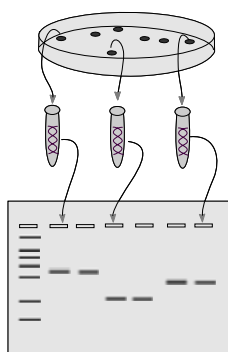


Figura 3. Amplificazione del DNA da coltura batterica

⁵ MRS *broth* a 37°C x 24-48h, in anaerobiosi per i Lattobacilli; HHD *broth* a 37°C x 48-72h in aerobiosi, per i Bifidobatteri; M17 *broth* a 37°C x 24-48h in aerobiosi, per Streptococchi e Lactococchi; TSB a 37°C x 24-48h in aerobiosi, per i Bacilli sporigeni; Cooked meat medium a 37°C x 48-72h, per i Propionibatteri.

⁶ Tale procedura è risultata essere la più adatta allo scopo del lavoro; in alternativa possono essere utilizzati altri sistemi equivalenti compresi i kit di estrazione disponibili in commercio.

MODALITÀ DI CONTEGGIO DELLE COLONIE DOPO L'IDENTIFICAZIONE

Per ogni piastra presa in considerazione per la conta totale, selezionare un numero (A) di colonie (in genere $A = 5$) che presentano caratteristiche morfologiche simili e sottoporle a test di conferma (identificazione genetica) come indicato nella sezione “Metodi per l'identificazione genetica di microrganismi probiotici”. Sulla base della risposta dei test di identificazione, calcolare, per ogni piastra, il numero (a) di colonie conformi ai criteri di identificazione, usando la formula (35):

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

Dove:

b è il numero di colonie conformi ai criteri di identificazione tra le A colonie identificate

C è il numero totale di colonie presuntive contate su una piastra

Calcolare il numero N di microrganismi identificati presenti nel campione analizzato utilizzando la formula

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

sostituendo ΣC con Σa .

Esempio:

Prima diluizione considerata: 10^{-2} ,

Numero di colonie contate alla diluizione $10^{-2} = 160$

Delle 160 colonie contate, 10 sono state sottoposte ai test identificativi; 8 colonie sono risultate conformi ai criteri di identificazione.

$$a = \frac{b}{A} \times C = \frac{8}{10} \times 160 = 128$$

Seconda diluizione considerata: 10^{-3}

Numero di colonie contate alla diluizione $10^{-3} = 20$

Delle 20 colonie contate, 5 sono state sottoposte ai test identificativi; 4 colonie sono risultate conformi ai criteri di identificazione.

$$a = \frac{b}{A} \times C = \frac{4}{5} \times 20 = 16$$

In base ai risultati ottenuti dopo l'identificazione si procede al calcolo del numero di microrganismi identificati presenti nel campione in base alla formula:

$$N = \frac{\Sigma a}{V \times 1,1 \times d} = \frac{128 + 16}{0,1 \times 1,1 \times 10^{-3}} = \frac{144}{0,00011} = 1309090$$

Arrotondando il risultato il numero di microrganismi sarà 1300000 o $1,3 \times 10^6$ per grammo o millilitro di prodotto.

Per il calcolo dell'incertezza di misura, previsto per i metodi microbiologici di numerazione batterica fare riferimento alla norma ISO 19036 (47).

In caso di specie batterica diversa da quella attesa riportare il risultato come segue: *meno di 1/d nome della specie ricercata per millilitro o per grammo di prodotto analizzato* dove *d* è il fattore di diluizione della sospensione iniziale o della prima diluizione inoculata.

CONCLUSIONI

La partita o sottopartita è ritenuta conforme alle linee guida ministeriali o a quanto dichiarato in etichetta se:

- la carica batterica è uguale o superiore al dichiarato in etichetta;
- ogni microrganismo dichiarato è presente in forma vitale;
- la denominazione di specie è in accordo con la nomenclatura tassonomica riconosciuta dalla *International Union of Microbiological Societies*;
- il prodotto non contiene specie patogene (*Salmonella* spp e *L. monocytogenes*, secondo il regolamento CE 1441/2007) (33).

Sono in corso approfondimenti per includere le metodologie con cui procedere alla numerazione e identificazione di specie probiotiche utilizzate in prodotti immessi sul mercato dopo il 2006.

Si stanno altresì valutando metodi molecolari con cui poter effettuare contemporaneamente conta e identificazione di specie.

BIBLIOGRAFIA

1. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998;39:237-8.
2. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Amin Nutr Health* 1974;29:4-8.
3. Fuller R. Probiotics in man and animal. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-78.
4. Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. Probiotics: a general view. In: Wood BJB (Ed.). *The lactic acid bacteriain health and disease*. Chapman & Hall, New York, NY; 1992(1). P. 209-224.
5. Salminen S. Functional dairy products with *Lactobacillus GG* *Nutr Rev* 1996;54(2):1-3.
6. Schaafsma GJ. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *Int Dairy Nutr Newsl* 1996;5:23-4.
7. Joint FAO/WHO Expert Consultation on *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powdered milk with live lactic acid bacteria*. Cordoba, Argentina 1-4 October 2001. Rome: FAO; 2001.
8. FAO/WHO Working Group. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. Rome: FAO; 2002.
9. Italia. Ministero della Salute. *Linee guida probiotici e prebiotici*. 2005. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ministerosalute.it/alimenti/nutrizione/linee.jsp?lang=italiano&label=pro&id=94&dad=s>; ultima consultazione 10/10/2008.
10. Italia. Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 111. Attuazione della direttiva 89/398/CEE concernente i prodotti alimentari destinati ad una alimentazione particolare. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 39, 17 febbraio 1992.
11. EFSA (European Food Safety Authority). *Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee*. 19 novembre 2007. Disponibile all'indirizzo: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178667590178.htm; ultima consultazione 10/10/2008.
12. ISO 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura* Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
13. Unione Europea. Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002, per il ravvicinamento delle legislazioni degli stati membri relative agli integratori alimentari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L183/51, 12 luglio 2002.
14. Italia. Decreto legislativo 21 maggio 2004, n.169. Attuazione della direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari. *Gazzetta Ufficiale* n. 164, 15 luglio 2004.
15. Italia. Decreto Presidente Repubblica 26 marzo 1980 n. 327. Regolamento di esecuzione delle norme contenute nella legge 30.4.62, n. 283, e successive modificazioni, concernente la disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande. *Gazzetta Ufficiale* n. 193, 16 luglio 1980.
16. Kwon HS, Yang EH, Lee SH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY. Rapid identification of potentially probiotic Bifidobacterium species by multiplex PCR using species-specific primer based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 2005Sep;250(1):55-62.
17. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Kado Y, Takada T, Matsumoto K, Tanaka R. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primer for analysis of human intestinal Bifidobacteria. *Appl Env Microbiol* 2004Jan; 167-73.

18. Kao TY, Liu Y, Shyu YT. Identification of *Lactobacillus* spp in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Res Intern* 2007;40:71-9.
19. Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primer based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 2004;239 (2):267-75.
20. Desai AR, Shah NP, Powell IB. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. *J Dairy Sci* 2006;89:3345-51.
21. Drisko J, Bischoff B, Giles C, Adelson ME, Rao Raja-Venkitesh S, McCallum R. Evaluation of five probiotic products for label claims by DNA extraction and polymerase chain reaction analysis. *Dig Dis Sci* 2005;50(6):1113-7.
22. Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* and *L delbrueckii subsp lactis*. *Appl Env Microbiol* 1999;Oct:4351-6.
23. Chagnaud P, Machinis K, Coutte LA, Marecat A, Mercenier A. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J Microbiol Methods* 2001;44:129-148.
24. Fortina MG, Ricci G, Mora D, Parini C, Manachini PL. Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with pepC, pepN and htrA targeted primer. *FEMS Microbiol Lett* 2001;198:85-9.
25. Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J. Identification of *Lactobacilli* by pheS and rpoA gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:2777-89.
26. Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F, Andolfi R, Moschetti G. 16S–23S rDNA Intergenic Spacer Region Polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence. *Analysis System Appl Microbiol* 2002;25:520-7.
27. Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T. Characterization of the 16S–23S and 23S–5S rRNA intergenic spacer regions of dairy *Propionibacteria* and their identification with species-specific primer by PCR. *Int J Food Microbiol* 2001;68:45-52.
28. Tilsala-Timisjarvi A, Alatossava T. Development of oligonucleotide primer from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int J Food Microbiol* 1997;35:49-56.
29. Tharmaraj N, Shah NP. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J Dairy Sci* 2003;86:2288-96.
30. ISO 6579:2002;Corr.1:2004. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella* spp. Geneva: International Organization for Standardization; 2002.
31. ISO 11290-1;Amendement 1:2004; *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Listeria monocytogenes*. Geneva: International Organization for Standardization; 1996.
32. ISO 11290-2;Amendement 1:2004; *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Listeria monocytogenes*. Geneva: International Organization for Standardization; 1998.
33. Unione Europea. Commission Regulation n.1441/2007 of 05 December 2007 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 7 December 2007, L322/12.

34. ISO 8261. *Guida generale per la preparazione di campioni di prova, sospensione iniziale e diluizione decimale per l'esame microbiologico*. Geneva: International Organization for Standardization; 2001.
35. ISO 7218. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*. Geneva: International Organization for Standardization; 2007.
36. Leuschner RGK, Bew J. Enumeration of probiotic bacilli spores in animal feed: interlaboratory study. *J AOAC Int* 2003;86(3):568-75.
37. McDonald LC, McFeeters RF, Daeschel MA, Fleming HP. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl Env Microbiol* 1987;53(6):1382-4.
38. ISO 15214. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – colony count technique at 30 °C*. Geneva: International Organization for Standardization; 1998.
39. Leuschner RGK, Bew J, Coeuret V, Vernoux JP, Gueguen M. A collaborative study for the enumeration of probiotic lactobacilli in animal feed. *Food Microbiol* 2003;20:57-66.
40. Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotics products. *Int Journ of Food Microbiol* 2004;97:147-56.
41. International IDF Standard 149. *Lactic acid starters*. Brussels: Federation Internationale de Laiterie-International Dairy Federation; 1991.
42. Lee HM, Lee Y. A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. *Letters in Appl Microbiol* 2008;46:676-81.
43. Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 2007;8:44-61.
44. Hollywood NW, Giles JE, Doelle HW. The enumeration of *Propionibacterium shermanii* in Swiss type cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 1983;38(1):7-9.
45. International IDF Standard 117A. *Enumeration of characteristic microorganisms-colony count technique at 37 °C*. Brussels: Federation Internationale de Laiterie-International Dairy Federation; 1988.
46. International IDF Standard 146. *Identification of characteristic microorganisms (Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus and Streptococcus salivarius subsp. thermophilus)*. Brussels: Federation Internationale de Laiterie-International Dairy Federation; 1991.
47. ISO 19036. *Microbiology of food and animal feeding stuffs –Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations* Geneva: International Organization for Standardization; 2006.

APPENDICE
Terreni di coltura

ACQUA PEPTONATA TAMPONATA (BPW)

Digerito enzimatico di caseina	10,0g
Cloruro di sodio	5,0g
Idrogeno fosfato di sodio dodecaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0g
Diidrogeno fosfato di potassio (KH_2PO_4)	1,5g
Acqua	1000mL

Preparazione

Sciogliere in 1000mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato. Riscaldare se necessario. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15min.
pH 7,0 +/- 0,2 a 25 °C.

COOKED MEAT MEDIUM (TERRENO ALLA CARNE COTTA)

Muscolo di cuore	454,0g
Peptone	10,0g
Estratto di carne	10,0g
Cloruro di sodio	5,0g
Glucosio	2,0g
Acqua	1000mL

Preparazione

Sospendere 1 grammo del terreno completo disidratato in 10mL di acqua distillata contenuti in una provetta. Lasciare a riposo per 15 minuti e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Evitare di raffreddare le provette troppo rapidamente.
pH 7,2 ± 0,2 a 25 °C

HHD AGAR

Fruttosio	2,5g
Saccarosio	0,2g
Potassio fosfato monobasico	2,5g
Idrolisato triptico di caseina	10g
Peptone di soia	1,5g
Idrolisato acido di caseina	3,0g
Estratto di lievito	1,0g
Verde bromo cresolo	0,066g
Agar	20,0g
Acqua	1000mL

Preparazione

Sospendere in 1000mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato*. Aggiungere 1g di Tween 80. Scaldare fino ad ebollizione, sotto continua agitazione Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
pH finale 7,0±0,1.

*nella forma commerciale il terreno completo è presente solo nella formulazione HHD brodo, per ottenere il terreno agarizzato basta aggiungere 20 grammi di agar a 1000mL di terreno completo.

HHD BRODO

Fruttosio	2,5g
Saccarosio	0,2g
Potassio fosfato monobasico	2,5g
Idrolisato triptico di caseina	10,0g
Peptone di soia	1,5g
Idrolisato acido di caseina	3,0g
Estratto di lievito	1,0g
Verde bromo cresolo	0,066g
Acqua	1000mL

Preparazione

Sospendere in 1000mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato. Aggiungere 1g di Tween 80. Scaldare fino ad ebollizione, sotto continua agitazione. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
pH finale 7,0±0,1.

MAXIMUM RECOVERY DILUENT (PEPTONE SALINE DILUENT) (MRD)

Peptone	1,0g
Cloruro di sodio	8,5g
Acqua	1000mL

Preparazione

Sospendere in 1000mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
pH 7,0 ± 0,2 a 25 °C.

M17 BRODO

Tryptone	5,0g
Peptone di soia	5,0g
'Lab-Lemco' powder	5,0g
Estratto di lievito	2,5g
Acido ascorbico	0,5g
Solfato di magnesio	0,25g
Di-sodio-glycerofosfato	19,0g
Acqua	950mL

Preparazione

Sospendere in 950 mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato. Portare ad ebollizione e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 50 °C e aggiungere 50 mL di una soluzione sterile di lattosio al 10%.
pH $6,9 \pm 0,2$ a 25 °C

Soluzione di lattosio al 10%

Dissolvere 10 g di Lattosio in 100 mL di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti o per filtrazione su membrana da 0,2 µm.

M17 AGAR

Tryptone	5,0
Peptone di soia	5,0
Estratto di carne	5,0
Estratto di lievito	2,5
Acido ascorbico	0,5
Magnesio solfato	0,25
Di-sodio-glicerofosfato	19,0
Agar	11,0
Acqua	950mL

Preparazione

Sospendere in 950 mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato. Portare ad ebollizione e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 50 °C e aggiungere 50 mL di una soluzione sterile di lattosio al 10%.
pH $6,9 \pm 0,2$ a 25 °C

Soluzione di Lattosio al 10%

Dissolvere 10g di Lattosio in 100 mL di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti o per filtrazione su membrana da 0,2 µm.

MRS AGAR

Peptone	10,0g
Estratto di carne	10,0g
Estratto di lievito	4,0g
Glucosio	20,0g
Tween 80	1,08g
Idrogeno fosfato di-potassio	2,0g
Sodio acetato 3H ₂ O	5,0g
Triammonio citrato	2,0g
Magnesio solfato 7H ₂ O	0,2g
Manganese solfato 4H ₂ O	0,05g
Agar	da 12,0g a 18,0g ^a
Acqua	1000mL

^a dipende dal potere gelificante dell'agar

Preparazione

Sospendere in 1000mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato. Portare ad ebollizione e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

pH: 6,2 ± 0,2 a 25 °C

Distribuire il terreno raffreddato in piaster di Petri.

MRS AGAR acidificato

Procedure come per l'MRS agar

pH 5,4±0,1 a 25 °C

MRS BRODO

Peptone	10,0g
Estratto di carne	10,0g
Estratto di lievito	4,0g
Glucosio	20,0g
Tween 80	1,08g
Idrogeno fosfato di-potassio	2,0g
Sodio acetato 3H ₂ O	5,0g
Triammonio citrato	2,0g
Magnesio solfato 7H ₂ O	0,2g
Manganese solfato 4H ₂ O	0,05g

Preparazione

Sospendere in 1000mL di acqua distillata i vari componenti o l'opportuna quantità del terreno completo disidratato. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

pH 6,2 ± 0,2 a 25 °C

PROPIONIBACTERIUM ISOLATION MEDIUM

Sodio lattato	10,0g
Peptone	20,0g
Estratto di lievito	10,0g
Agar	15,0g
Acqua	1000mL

Preparazione

Sospendere in 1000mL di acqua distillata i vari componenti. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

pH 7,0± 0,2 a 25 °C

Distribuire il terreno raffreddato in piastre di Petri.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, ottobre-dicembre 2008 (n. 4) 15° Suppl.