

## Studio della "shelf-life" di terreni critici

S. Ulisse, A. Peccio, G. Orsini & B. Di Emidio<sup>†</sup>

### Riassunto

La "shelf-life" o vita di scaffale di un terreno colturale è il tempo di validità massima raggiungibile in condizioni di preparazione e conservazione ottimali. I fattori che influenzano la "shelf-life" sono, oltre alla composizione del terreno stesso, il metodo di sterilizzazione, le modalità di conservazione e confezionamento, la temperatura di stoccaggio e l'esposizione alla luce. Per poter definire la "shelf-life" di un terreno di coltura occorre valutarne le caratteristiche chimico-fisiche essenziali al fine di ottenere la corretta crescita e caratterizzazione di uno specifico microrganismo. La presente ricerca è stata condotta da marzo a settembre 2003 su dodici terreni colturali "critici", aventi cioè una "shelf-life" codificata minore o uguale a trenta giorni, ciascuno dei quali prodotto in tre lotti distinti per un totale di 5940 campioni. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di definire un tempo di validità maggiore di quello codificato per ciascun terreno oggetto di studio, mediante la valutazione dei seguenti parametri: calo ponderale, pH, fertilità e sterilità. I tempi di validità osservati per ciascun terreno sono stati superiori rispetto a quelli codificati. La nuova "shelf-life" assegnata tiene conto sia delle esigenze operative delle strutture organizzative complesse sia dell'efficacia del terreno stesso dipendente dalle caratteristiche chimico-fisiche e dalle modalità di stoccaggio e conservazione.

### Parole chiave

Terreni di coltura, "Shelf-life", Controllo di qualità, Metodo ecometrico.

### Introduzione

---

I terreni colturali sono substrati nutritivi più o meno complessi formulati per la coltivazione di microrganismi. Essi devono soddisfare le esigenze nutrizionali dei microrganismi che, per vivere e replicarsi, hanno bisogno di fonti di azoto, carbonio, idrogeno, ossigeno, zolfo, fosforo, sodio, potassio, magnesio, ferro e manganese.

I componenti principali dei terreni di coltura sono suddivisi nelle seguenti classi: peptoni, carboidrati, indicatori, agenti selettivi, agenti solidificanti, arricchimenti, substrati enzimatici cromogenici e fluorogenici (1).

Ciascun componente esplica, quando è inserito nella formulazione di un terreno di coltura, una ben precisa funzione che, oltre a favorire la crescita di determinati microrganismi piuttosto che di altri, influenza la maggiore o minore validità del terreno stesso nel tempo.

La validità di un terreno colturale o "shelf-life" (vita di scaffale) è intesa come il tempo massimo entro il quale un terreno conserva tutte le caratteristiche chimico-fisiche essenziali per la corretta crescita e caratterizzazione di uno specifico microrganismo.

I fattori che influenzano maggiormente la "shelf-life" dei terreni colturali, oltre alla sua composizione,

<sup>†</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise 'G. Caporale', Campo Boario, 64100 Teramo, Italia

sono: il metodo di sterilizzazione (autoclavatura, filtrazione) e le modalità di conservazione (confezionamento, temperatura di stoccaggio ed esposizione alla luce).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di assegnare a ciascun terreno di coltura oggetto di studio, una "shelf-life" maggiore di quella attualmente codificata dal Reparto di Produzione Terreni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZSA&M) di Teramo-Italia.

Non sono disponibili dati bibliografici relativi a studi condotti da altri Autori su questa materia di ricerca e spesso le norme di riferimento e i manuali delle ditte distributrici di terreni colturali, che occasionalmente indicano il tempo di validità, riportano una "shelf-life" tanto breve da non essere conciliabile con le esigenze operative caratterizzanti le strutture organizzative complesse.

I terreni sottoposti allo studio sono stati scelti tra quelli maggiormente utilizzati dai Reparti della Sede Centrale e delle Sezioni Diagnostiche dell'IZSA&M ed aventi una "shelf-life" codificata minore o uguale a trenta giorni.

I terreni scelti sono i seguenti: *Campylobacter* blood free agar (Karmali) (8,9), *Campylobacter* selective medium (Skirrow) (8,9), *Bacillus cereus* agar (MYP agar) (7), Hayflick agar (11), Hayflick brodo (11), *Pseudomonas* CN agar base (3), Lattosio TTC agar con Tergitolo (4), Aesculin bile azide agar, (5), Slanetz Bartley agar con TTC (5), Thiaucourt brodo (2,13,14), Thiaucourt agar (2,13,14) e XLD (xylose lesine deoxycholate) medium (6).

## Materiali e metodi

### Produzione dei terreni oggetto della ricerca

La ricerca è stata condotta da marzo 2003 a settembre 2003. La descrizione dettagliata della produzione è stata riservata esclusivamente a quei terreni la cui formulazione completa non è disponibile in

commercio. Per ogni terreno oggetto della ricerca sono stati prodotti tre lotti distinti secondo le modalità riportate in Tabella I.

### Parametri e tempi di verifica della "shelf-life" dei terreni oggetto della ricerca

La "shelf-life" dei terreni di coltura oggetto della ricerca è stata verificata mediante la valutazione dei seguenti parametri: calo ponderale (per i terreni in agar), pH, sterilità e fertilità.

La verifica dei parametri si è svolta, successivamente alle date di scadenza codificate, a partire dal giorno 30/04/2003 (T<sub>1</sub>).

I controlli successivi sono stati effettuati ai giorni 15/05/2003 (T<sub>2</sub>), 27/05/2003 (T<sub>3</sub>), 03/06/2003 (T<sub>4</sub>), 10/06/2003 (T<sub>5</sub>), 17/06/2003 (T<sub>6</sub>), 26/06/2003 (T<sub>7</sub>), 09/07/2003 (T<sub>8</sub>), 16/07/2003 (T<sub>9</sub>), 28/07/2003 (T<sub>10</sub>), 26/08/2003 (T<sub>11</sub>), 10/09/2003 (T<sub>12</sub>).

### Etichettatura, pesatura, confezionamento e stoccaggio

Ogni singola piastra e/o provetta di ciascun lotto dei terreni colturali oggetto della ricerca prodotti è stata identificata mediante un'etichetta adesiva riportante: il codice del terreno, il numero del lotto di produzione ed il numero progressivo del singolo pezzo all'interno del lotto di produzione.

Ogni singola piastra dei terreni in agar è stata pesata utilizzando una bilancia tecnica (Sartorius). Per ciascun lotto dei terreni colturali oggetto della ricerca prodotti sono stati confezionati gruppi di nove piastre (per i terreni in agar) e di sei provette (per i terreni liquidi) mediante pellicola termoretraibile.

Dopo il confezionamento, i terreni sono stati immediatamente stoccati in celle frigorifere a +5°C ± 3°C all'interno di appositi contenitori.

### Campionamento

#### Terreni in agar

Per ciascun lotto di ogni terreno colturale in agar oggetto della ricerca è stata prelevata un'unità campionaria di nove piastre, in conformità alla

procedura operativa interna applicabile in questa materia (10).

Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in agar è quindi stato di ventisette piastre.

#### **Terreni in brodo**

Per ciascun lotto di ogni terreno colturale in brodo oggetto della ricerca è stata prelevata un'unità campionaria di sei provette, in conformità alla procedura operativa interna applicabile in questa materia (10).

Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in brodo è quindi stato di diciotto provette.

#### **Verifica del calo ponderale**

Ad ogni punto di verifica ( $T_1$ - $T_{12}$ ) di ogni terreno colturale in agar, il campione di ventisette piastre, costituito dall'unità campionaria di nove piastre per ciascuno dei tre lotti prodotti, è stato prelevato e pesato mediante bilancia tecnica (Sartorius) allo scopo di valutare la % di calo ponderale.

#### **Verifica del pH**

Ad ogni punto di verifica ( $T_1$ - $T_{12}$ ) di ogni terreno colturale oggetto della ricerca, il valore del pH per ciascuno dei tre lotti prodotti, è stato misurato mediante pH-metro (Mettler-Toledo), tarato a pH 7 e a pH 4, come segue:

#### **Terreni in agar**

Su due delle nove piastre costituenti l'unità campionaria di ciascun lotto (già sottoposte alla verifica del calo ponderale). Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in agar è quindi stato di sei piastre.

#### **Terreni in brodo**

Su due delle sei provette costituenti l'unità campionaria di ciascun lotto. Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in brodo è quindi stato di sei provette.

#### **Sterilità**

Ad ogni punto di verifica ( $T_1$ - $T_{12}$ ) di ogni terreno

colturale oggetto della ricerca, la sterilità di ciascuno dei tre lotti prodotti, è stata valutata come segue:

#### **Terreni in agar**

Incubazione in termostato di due piastre a  $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  per 48 h e di altre due piastre a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  per 48 h (delle nove piastre costituenti l'unità campionaria di ciascun lotto già sottoposte alla verifica del calo ponderale).

Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in agar è quindi stato di dodici piastre.

#### **Terreni in brodo**

Incubazione in termostato di una provetta a  $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  per 48 h e di un'altra provetta a  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  per 48 h delle sei provette costituenti l'unità campionaria di ciascun lotto.

Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in brodo è quindi stato di sei provette.

#### **Fertilità**

Ad ogni punto di verifica ( $T_1$ - $T_{12}$ ) è stata valutata per ogni terreno colturale oggetto della ricerca, la fertilità di ciascuno dei tre lotti prodotti, osservando la crescita, dopo opportuna incubazione, dei ceppi di controllo (Tabella II) seminati secondo le seguenti modalità:

#### **Terreni in agar**

Per i terreni prodotti in piastre da 90 mm di  $\emptyset$ , e precisamente C157, C158, C205, C328, la valutazione della fertilità è stata eseguita utilizzando il metodo ecometrico (12).

Per i terreni per micoplasmi prodotti in piastre da 60 mm di  $\emptyset$ , e precisamente C252 e C324, la valutazione della fertilità è stata eseguita mediante semina di una goccia della brodocoltura del ceppo di controllo idoneo per il tipo di terreno e, dopo opportuna incubazione, verifica della crescita.

Per gli altri terreni prodotti in piastre da 60 mm di  $\emptyset$ , e precisamente C273, C280, C281, C283, la valutazione della fertilità è stata eseguita mediante

Tabella I  
Modalità di preparazione dei 12 terreni colturali oggetto della ricerca

Terreno colturale	Codice interno	Terreno base e modalità	Lotti prodotti	Piastre Petri/ provette
<i>Campylobacter</i> blood free agar (Karmali)	C157	Biolife, Milano, Italia Karmali antibiotic supplement (Biolife)	484 486 487	180 piastre Petri Ø 90 mm
<i>Campylobacter</i> selective medium (Skirrow)	C158	Terreno base Blood agar base medium N° 2 (Oxoid, Basingstoke, UK) <i>Campylobacter</i> growth supplement (Oxoid) <i>Campylobacter</i> Skirrow supplement (Oxoid) Sangue equino lisato (IZSA&M, Teramo)	611 613 624	180 piastre Petri Ø 90 mm
<i>Pseudomonas</i> CN agar base	C273	Terreno base (Oxoid) glicerolo 1% (v/v) (Carlo Erba) <i>Pseudomonas</i> CN supplement (Oxoid)	524 525 526	180 piastre Petri Ø 60 mm
Lactose TTC agar con tergitolo	C280	Terreno base disidratato (Merck, Darmstadt, Germania), soluzione di TTC 0,05% (BDH, Poole, UK)	621 622 631	180 piastre Petri Ø 60 mm
Aesculin bile azide agar	C281	Terreno completo disidratato (Biolife)	588 606 607	162 piastre Petri Ø 60 mm
Slanetz Bartley agar con TTC	C283	Terreno base disidratato (Biolife) soluzione di TTC 1% (BDH, Poole, UK)	572 573 574	180 piastre Petri Ø 60 mm
XLD agar	C328	Terreno completo disidratato (Oxoid)	574 587 598	162 piastre Petri Ø 90 mm
<i>Bacillus cereus</i> agar (MYP agar)	C205	Per ogni lotto: 40 g peptone batteriologico (Oxoid) 4 g estratto di carne (Biolife) 40 g cloruro di sodio (Carlo Erba) 40 g D-mannitolo (Carlo Erba) 0,1 g rosso fenolo (Sigma) 60 g agar batteriologico (Biolife) sono stati sciolti per riscaldamento in 4 litri di acqua deionizzata. Dopo aver verificato la correttezza del pH ( $7,2 \pm 0,2$ ), il terreno è stato autoclavato a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ e, una volta raffreddato in bagnomaria a $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , supplementato con 40 ml di una soluzione $10^6$ UI/100 ml di polymyxin B sulphate (Sigma) e con 400 ml di emulsione d'uovo (Biolife)	472 475 476	200 piastre Petri Ø 90 mm
Hayflick agar	C252	Per ogni lotto: 70 g PPLO agar (Difco) 20 g triptosio (Oxoid) 2 g glucosio (Riedel-de-Haën) sono stati sciolti per riscaldamento in 1400 ml di acqua deionizzata. Dopo aver verificato la correttezza del pH ( $7,8 \pm 0,2$ ), il terreno base è stato autoclavato a $115^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per $30 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ e, una volta raffreddato in bagnomaria a $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , supplementato con 280 ml di siero equino inattivato (IZSA&M) e 560 000 UI di penicillina G (Sigma)	438 446 455	108 piastre Petri Ø 90 mm

Tabella I (continua)

Terreno colturale	Codice interno	Terreno base e modalità	Lotti prodotti	Piastre Petri/ provette
Hayflick brodo	C253	Per ogni lotto: 21 g PPLO broth (Difco) 10 g triptosio (Oxoid) 1 g glucosio (Riedel-de-Haën) 10 g estratto di lievito (Panreac) sono stati sciolti per riscaldamento in 700 ml di acqua deionizzata. Dopo aver verificato la correttezza del pH ( $7,8 \pm 0,2$ ), il terreno base è stato sterilizzato mediante filtrazione con un filtro sterile da $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore) e quindi supplementato con 140 ml di siero equino inattivato (IZSA&M) e con 280 000 UI di penicillina G (Sigma)	439 447 456	140 provette ciascuna contenente 5 ml
Thiaucourt brodo	C323	Per ogni lotto, 21 g PPLO broth (Difco) è stato sciolto in 600 ml di acqua deionizzata. Dopo aver verificato la correttezza del pH ( $7,8 \pm 0,2$ ), il terreno base è stato autoclavato a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per $1,5 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ e, una volta raffreddato in bagnomaria $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , supplementato con: 10 ml di una soluzione di tallio acetato all'1% (Alpha Aesar Johnson Matthey) sterilizzata mediante filtrazione con un filtro sterile $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore), 10 ml di una soluzione di ampicillina (Sigma) all'1% (p/v), 100 ml di una soluzione al 4% (p/v) di sodio piruvato (Baker) e glucosio (Riedel-de-Haën) all'1% (p/v) sterilizzati per filtrazione con un filtro sterile da $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore), 200 ml di siero equino inattivato (IZSA&M) e 100 ml di estratto di lievito fresco (IZSA&M) al 25% (p/v) sterilizzato per filtrazione con filtri di diametro decrescente fino al filtro sterile finale di $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore)	437 445 457	200 provette ciascuna contenente 5 ml
Thiaucourt agar	C324	Per ogni lotto, 70 g PPLO agar (Difco) è stato sciolto in 1200 ml di acqua deionizzata. Dopo aver verificato la correttezza del pH ( $7,8 \pm 0,2$ ), il terreno base è stato autoclavato a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ per $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ e, una volta raffreddato in bagnomaria $50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , supplementato con: 20 ml di una soluzione di tallio acetato all'1% (p/v) (Alpha Aesar Johnson Matthey) sterilizzata con filtrazione con un filtro sterile $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore), 20 ml di una soluzione di ampicillina (Sigma) all'1% (p/v), 200 ml di una soluzione al 4% (p/v) di sodio piruvato (Baker) e glucosio (Riedel-de-Haën) all'1% (p/v) sterilizzati per filtrazione con un filtro sterile da $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore), 400 ml di siero equino inattivato (IZSA&M) e 200 ml di estratto di lievito fresco (IZSA&M) al 25% (p/v) sterilizzato per filtrazione con filtri di diametro decrescente fino al filtro sterile finale di $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore)	436 444 454	108 piastre Petri $\varnothing 60 \text{ mm}$

TTC 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride  
 XLD xylose lysine deoxycholate  
 MYP mannitol-egg yolk-polymyxin  
 PPLO pleuropneumonia-like organism

Tabella II  
 Ceppi di controllo, metodo utilizzato, condizioni di incubazione e risultati attesi dei 12 terreni colturali "critici"

Terreno	Ceppi di controllo	Met.	Condizioni di incubazione	Risultati attesi
C157	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	E	42°C x 48 h in microaerofilia	<i>C. jejuni</i> : crescita ≥ 70% <i>E. coli</i> : crescita 0%
C158	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	E	42°C x 48 h in microaerofilia	<i>C. jejuni</i> : crescita ≥ 70% <i>E. coli</i> : crescita 0%
C205	<i>Bacillus cereus</i> 66/10	E	37°C x 24 h aerobiosi	<i>B. cereus</i> : crescita ≥ 70%
C252	<i>Mycoplasma agalactiae</i> (PG2)	S	37°C x 48-72 h 10% CO <sub>2</sub>	Crescita
C253	<i>Mycoplasma agalactiae</i> (PG2)	S	37°C x 48-72 h 10% CO <sub>2</sub>	Crescita
C273	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	S	37°C x 24 h aerobiosi	Crescita
C280	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	S	37°C x 24 h aerobiosi	Crescita
C281	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	S	37°C x 24 h aerobiosi	Crescita
C283	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	S	36°C x 44 h aerobiosi	Crescita
C323	<i>Mycoplasma agalactiae</i> (PG2)	S	37°C x 48-72 h 10% CO <sub>2</sub>	Crescita
C324	<i>Mycoplasma agalactiae</i> (PG2)	S	37°C x 48-72 h 10% CO <sub>2</sub>	Crescita
C328	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 31194 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	E	37°C x 24 h aerobiosis	<i>S. Enteritidis</i> : crescita ≥ 70% <i>E. coli</i> : crescita 0%

E metodo ecometrico  
 S semina

una semplice semina per striscio dei ceppi di controllo poiché le ridotte dimensioni delle piastrine non consentono di applicare correttamente il metodo ecometrico (sovrapposizioni di crescita batterica).

Per ciascun terreno in agar sono state utilizzate tre delle nove piastrine costituenti l'unità campionaria di ciascun lotto (già sottoposte alla verifica del calo ponderale).

Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in agar è quindi stato di nove piastrine.

#### **Terreni in brodo per micoplasmi (C253 e C323)**

La semina è stata fatta introducendo tre gocce della brodocoltura del ceppo di controllo idoneo per il tipo di terreno in due delle sei provette costituenti l'unità campionaria e, dopo opportuna incubazione, è stata effettuata la semina della brodocoltura sul terreno selettivo idoneo per



verificarne la crescita.

Il campione sottoposto a verifica di volta in volta per ciascun terreno in brodo è quindi stato di sei provette.

### **Criteri di accettabilità**

#### **Calo ponderale**

Il valore del calo ponderale nel tempo dei campioni dei lotti di ciascun terreno di coltura deve essere minore o uguale al 5%.

#### **pH**

Il valore del pH dei campioni di ogni singolo lotto di ciascun terreno di coltura deve rientrare nei limiti di tolleranza tipici del terreno stesso.

#### **Sterilità**

I campioni di ogni singolo lotto di ciascun terreno di coltura devono risultare sterili dopo incubazione a  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 48 h in condizioni di aerobiosi.

#### **Fertilità**

I campioni di ogni singolo lotto di ciascun terreno di coltura devono risultare fertili dopo opportuna incubazione con i ceppi di controllo positivo.

Per i terreni nei quali il metodo ecometrico è applicabile (C157, C158, C205, C328) la crescita dei ceppi di controllo positivo, incubati nelle condizioni opportune, deve essere maggiore o uguale al 70% (D5, C5, B4 etc.) mentre la crescita dei ceppi di controllo negativo, quando previsti (C157, C158, C328), non deve essere possibile 0% (Tabella II).

La non conformità a ciascuno di questi parametri da parte di una singola unità campionaria, rappresentante uno dei tre lotti di ciascun terreno di coltura, ha comportato l'emissione di una valutazione di non idoneità per l'intero campione residuo del terreno stesso.

## **Risultati**

### **Calo ponderale**

Durante tutto il periodo di osservazione, le piastre dei terreni di coltura C205, C252, C273, C280,

C281, C283 e C324 non hanno mai presentato, in ciascun punto di osservazione, un calo peso percentuale medio superiore al 5% (Fig. 1).

Il superamento di questo valore si è invece verificato per il C157 tra il nono ed il decimo controllo ( $-5,30\%$  a  $T_{10}$ ), per il C158 tra il decimo e l'undicesimo controllo ( $-5,68\%$  a  $T_{11}$ ) e per il C328 tra l'undicesima e la dodicesima osservazione ( $-6,73\%$  a  $T_{10}$ ) (Fig. 1).

#### **pH**

Tutti i lotti dei seguenti terreni di coltura oggetto della ricerca hanno presentato variazioni del valore del pH che sono sempre rimaste all'interno dei limiti di tolleranza prefissati: C205, C252, C253, C280, C281, C283, C323 e C324.

I rimanenti terreni di coltura hanno invece superato al 12° controllo i limiti di tolleranza stabiliti: in particolare il C157 ha presentato a  $T_{12}$  un valore medio dei 3 lotti pari a pH 7,115 (limite di tolleranza inferiore: pH 7,2); il C158 a  $T_{12}$  ha presentato un valore medio di pH di 7,105, quindi 0,095 unità oltre il limite di tolleranza inferiore; il C273 al dodicesimo controllo ha presentato un pH medio di 6,587, più basso quindi del limite di tolleranza inferiore di 0,313 unità; anche il C328 a  $T_{12}$  ha presentato un valore medio di pH più basso del limite di tolleranza inferiore, in particolare di 0,072 unità (Fig. 2).

#### **Sterilità**

Tutti i lotti di ciascun terreno di coltura oggetto della ricerca, sono risultati sterili ad entrambi i punti di controllo ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) durante tutto il periodo di osservazione.

#### **Fertilità**

I tre lotti dei terreni di coltura C280, C281 e C283 in esame sono risultati fertili per tutto il periodo di osservazione; per gli altri terreni di coltura oggetto della ricerca invece, uno o due dei tre lotti esaminati al dodicesimo controllo sono risultati non fertili o hanno presentato un valore di fertilità percentuale (semina

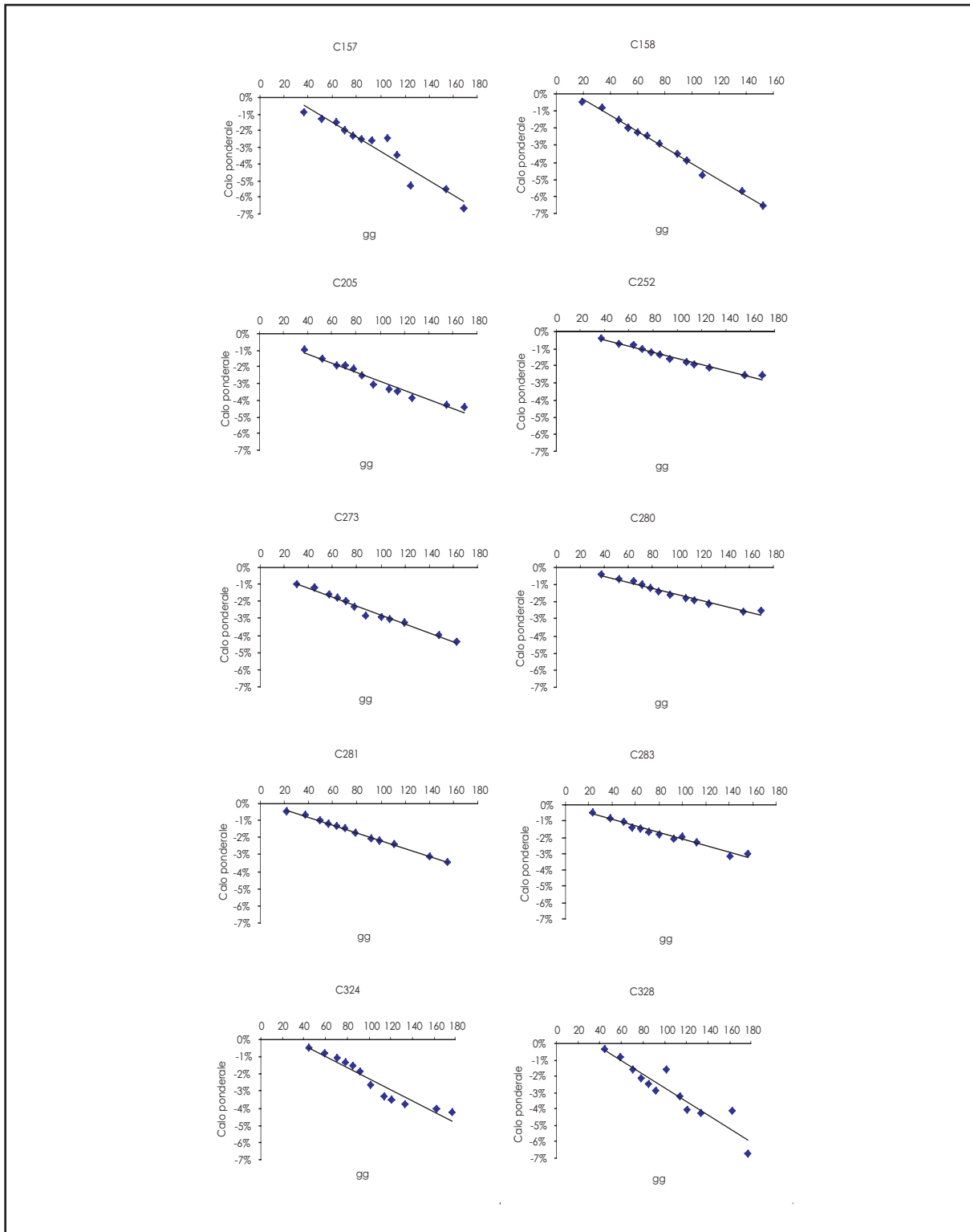


Figura 1  
Calo ponderale dei terreni in piastre Petri



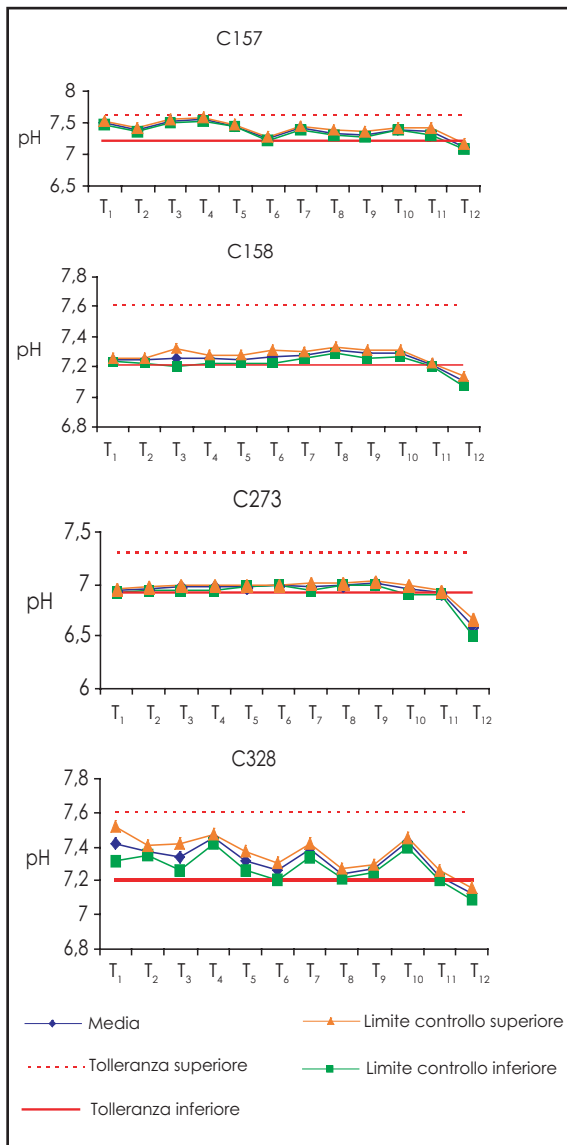


Figura 2  
Terreni con andamento del pH al di fuori dei limiti di tolleranza

ecometrica) inferiore al limite prefissato (Tabella III).

## Discussione

L'analisi dei parametri scelti per la verifica della "shelf-life" dei terreni di coltura oggetto della

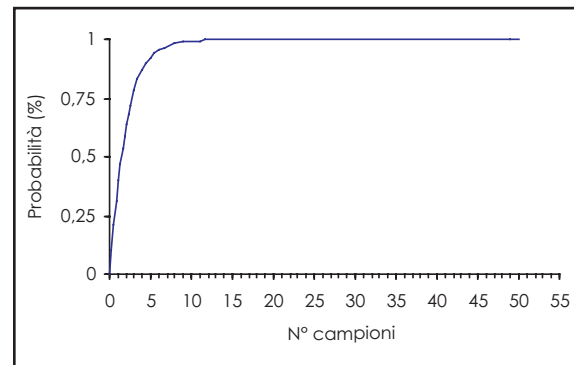


Figura 3  
Curva cumulativa della probabilità di rilevare un campione non idoneo per in una popolazione con prevalenza del 40%

ricerca (calo ponderale, pH, sterilità e fertilità), ha permesso di ricavare dei tempi di validità in eccesso rispetto ai codificati e di assegnare una "shelf-life" ai dodici terreni oggetto della ricerca, come mostrato in Tabella IV.

Si è potuto osservare come esista una notevole differenza tra la "shelf-life" attualmente codificata e quella ottenuta sperimentalmente.

Il numero dei giorni preso in considerazione, definito "shelf-life" osservata, si riferisce al tempo di controllo in cui tutti e quattro i parametri scelti rientravano nei range stabiliti.

La data di fine ricerca, corrispondente al T<sub>12</sub>, è stata stabilita dopo aver riscontrato, per alcuni terreni, che il valore del pH risultava fuori dai limiti di tolleranza, che uno o più dei tre lotti esaminati risultava non fertile o presentava un valore di fertilità percentuale inferiore al limite prefissato.

Sulla base dei limiti di "shelf-life" osservata per ciascun terreno di coltura, si è ritenuto opportuno assegnare loro una nuova "shelf-life" inferiore ai suddetti limiti (Tabella IV) corrispondente ad almeno altri due controlli favorevoli per ciascun lotto pari, sulla base di una distribuzione binomiale negativa cumulativa, ad una probabilità superiore al 95% di rilevare la presenza di almeno un campione

non idoneo per una prevalenza pari al 40% (Fig. 3). La scelta delle nuove date è congruente sia per soddisfare le esigenze operative di una struttura organizzativa complessa sia per garantire il mantenimento delle caratteristiche chimico-fisiche essenziali per la corretta crescita e caratterizzazione di uno specifico microrganismo.

Inoltre questa riduzione temporale fra la "shelf-life" osservata e la "shelf-life" assegnata costituisce un ulteriore elemento di sicurezza, ai fini dell'efficienza del terreno, nei confronti di errori che si possono verificare nello stoccaggio e/o nella conservazione del terreno stesso.

In ultima analisi è bene ribadire che, per quanto riguarda il controllo della fertilità eseguito sui terreni oggetto della ricerca, sono stati utilizzati ceppi di controllo ufficiali ATCC.

Sarebbe, quindi, interessante condurre ulteriori studi aventi come oggetto il confronto fra le

Tabella IV  
Tabella analitica di raffronto "shelf-life"

Terreno	"Shelf-life" (giorni)		
	codificata	osservata	assegnata
C157	3	113	90
C158	5	108	90
C205	2	155	120
C252	30	155	120
C253	30	162	120
C273	30	148	90
C280	10	148	90
C281	14	155	90
C283	14	156	90
C323	30	162	120
C324	30	162	120
C328	5	162	90

Tabella III  
Valori di fertilità (30 aprile-10 settembre 2003)  
(in neretto i valori inferiori al limite di accettabilità)

Lotto	Fertilità (espressa in % con il metodo ecometrico)											
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>12</sub>
C157												
484	95	75	80	80	80	80	80	80	70	90	70	70
486	95	75	80	80	80	80	80	80	70	90	70	<b>40</b>
487	95	75	80	80	80	80	80	80	70	90	70	<b>45</b>
C158												
611	95	75	80	80	80	80	80	80	70	90	70	<b>40</b>
613	95	75	80	80	80	80	80	80	70	90	70	70
624	95	75	80	80	80	80	80	80	70	90	70	70
C205												
472	95	80	95	80	80	80	80	90	90	90	80	<b>40</b>
475	95	80	95	80	80	80	80	90	90	90	80	80
476	95	80	95	80	80	80	80	90	90	90	80	80
C328												
587	100	100	100	100	90	95	100	80	70	70	70	<b>45</b>
598	100	100	100	100	90	95	100	80	70	70	70	<b>45</b>
608	100	100	100	100	90	95	100	80	70	70	70	70

T <sub>1</sub> 30 aprile	T <sub>5</sub> 10 giugno	T <sub>9</sub> 16 luglio
T <sub>2</sub> 5 maggio	T <sub>6</sub> 17 giugno	T <sub>10</sub> 28 luglio
T <sub>3</sub> 27 maggio	T <sub>7</sub> 26 giugno	T <sub>11</sub> 26 agosto
T <sub>4</sub> 3 giugno	T <sub>8</sub> 9 luglio	T <sub>12</sub> 10 settembre

percentuali di recupero (crescita) dei ceppi ATCC di uso comune, ormai adattati alla crescita sui terreni colturali, e i corrispondenti ceppi di campo.

## Ringraziamenti

Un caloroso ringraziamento va alla Dott.ssa Annamaria Conte per il competente supporto fornito durante l'elaborazione statistica dei dati.

## Bibliografia

1. Biolife Italiana SRL 2000. Biolife Manual, INGRAF Milano, 3rd Ed., Rev. 1. Biolife, Milano.
2. Bolske G., Mattsson J.G., Bascunana C.R., Bergstrom K., Wesonga H. & Johansson K.E. 1996. Diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia by detection and identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* by PCR and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, **34**, 785-791.
3. International Organization for Standardization (ISO) 1988. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration. ISO, Ginevra, ISO 12780:1988.
4. International Organization for Standardization (ISO) 2000. Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method. ISO, Ginevra, ISO 9308:2000.
5. International Organization for Standardization (ISO) 2000. Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method. ISO, Ginevra, ISO 7899-2:2000.
6. International Organization for Standardization (ISO) 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO, Ginevra, ISO 6579:2002.
7. International Organization for Standardization (ISO) 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Colony-count technique at 30°C. ISO, Ginevra, ISO 7932:2004.
8. International Organization for Standardization (ISO) 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. ISO, Ginevra, ISO 10272-1:2006.
9. International Organization for Standardization (ISO) 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 2: Colony-count technique. ISO, Ginevra, ISO/TS 10272-2:2006.
10. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale' (IZSA&M) 1999. Produzione dei terreni di coltura. IZSA&M, Teramo, IZS TE B5.1.2 SOP001.
11. Kibor A.C. & Waiyaki P.G. 1986. Growth of mycoplasma F-38 in medium B (modified Hayflick) and Newing's tryptose medium. *Bull Anim Health Prod Afr*, **34**, 157-159.
12. Mossel D.A.A., Bonants Van Laarhoven T.M.G., Ligtenberg Merkus A.M.T. & Werdler M.E.B. 1983. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardisation at the international level. *J Appl Bacteriol*, **54** (3), 313-327.
13. Thiaucourt F., Guérin C. Mady V. & Lefèvre P.-C. 1992. Diagnostic de la pleuropneumonie contagieuse caprine : améliorations récentes. *Rev Sci Tech*, **11**, 859-865.
14. Thiaucourt F. & Bolske G. 1996. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Rev Sci Tech*, **15**, 1397-141.