

## ALKALINE PEPTONE WATER

Terreno di coltura in polvere



Alkaline Peptone Water; da sinistra: provetta non inocolata e provetta con *Vibrio parahaemolyticus*

### 1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno per l'arricchimento di *Vibrio* spp. nei campioni della filiera alimentare.

### 2 - COMPOSIZIONE

#### PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA\*

Peptone	20 g
Sodio cloruro	20 g

\* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

### 3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Alkaline Peptone Water nella formulazione sopra indicata corrisponde al terreno raccomandato da ISO 21872-1.<sup>1</sup> La preparazione del terreno a concentrazione dimezzata (20 g/L) corrisponde alla formulazione indicata da FDA-BAM.<sup>2</sup> Il terreno è indicato per l'arricchimento di *Vibrio* spp. nei campioni della filiera alimentare.<sup>1,2</sup>

WHO,<sup>3</sup> all'interno del genere *Vibrio*, ha identificato tre specie che possono causare tossinfezioni alimentari: *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*; tuttavia la procedura descritta dalla norma ISO<sup>1</sup> consente l'isolamento anche di altre specie di *Vibrio* che possono causare infezioni nell'uomo. Secondo quanto riportato dalla norma ISO 21872-1, la determinazione delle specie potenzialmente enteropatogene richiede una procedura analitica suddivisa in quattro fasi: pre-arricchimento ed arricchimento in Alkaline Peptone Water con incubazioni differenziate a 37°C e 41,5°C, isolamento su TCBS Agar e su un secondo terreno a scelta dell'utilizzatore, prove di conferma.

Il recupero di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* da alimenti freschi è incrementato con l'incubazione a 41,5°C, mentre il recupero di *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* da alimenti congelati, secchi o salati è favorito dalla temperatura di 37°C. Il peptone fornisce azoto, carbonio, aminoacidi per la crescita batterica; il pH alcalino e l'alta concentrazione di sodio cloruro favoriscono la crescita dei vibrioli alofili.

### 4-PREPARAZIONE

Sospendere 40 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Nel caso si desiderasse preparare il terreno in accordo a FDA-BAM, pesare 20 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Scaldare fino a completa soluzione, distribuire in tubi con tappo a vite o in fiaschi ed autoclavare a 121°C per 15 minuti.

### 5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, ambra
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	limpido incolore o giallo paglierino
pH (20-25°C)	8,6 ± 0,1

### 6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Alkaline Peptone Water	Terreno di coltura in polvere	4010322	500 g (12,5/ 25L)

### 7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, fiaschi, beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

### 8-CAMPIONI

Il metodo d'analisi qui riportato, tratto dalla norma ISO 21872-1, è adatto all'esame dei campioni della filiera alimentare: prodotti destinati al consumo umano ed all'alimentazione degli animali, campioni ambientali nel settore della produzione alimentare e della manipolazione degli alimenti. Seguire le indicazioni delle norme ISO applicabili per il campionamento e la preparazione dei campioni.

### 9-PROCEDURA DELL'ANALISI

- Introdurre 25 g o mL di campione in 225 mL di Alkaline Peptone Water.
- Incubare la sospensione iniziale a 37 °C ± 1 °C per 6h ±1h (per la ricerca di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* in alimenti congelati, secchi o salati e di *V. vulnificus* in tutti i campioni). Incubare la sospensione iniziale a 41,5 °C ± 1 °C per 6h ±1h (per la ricerca di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* in alimenti freschi).
- Trasferire 1 mL della coltura di pre-arricchimento in provette contenenti 10 mL di Alkaline Peptone Water ed incubare a 41,5°C per 18 h ±1h, per la ricerca di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* ed a 37 °C ± 1 °C per 18 h ±1h per la ricerca di *V. vulnificus*.
- Per mezzo di ansa inoculare con la coltura del secondo arricchimento una piastra di TCBS Agar (REF402106) ed una piastra di un secondo terreno selettivo per vibrioli.
- Incubare il TCBS Agar a 37°C per 24h ± 3h. Incubare il secondo terreno secondo le indicazioni del produttore.





### 10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita batterica in Alkaline Peptone Water è evidenziata dallo sviluppo di torbidità nel brodo.

Su TCBS Agar *V.cholerae* sviluppa colonie lisce, gialle (saccarosio positive), con diametro di 1-2 mm, *V.parahaemolyticus* e *V.vulnificus* sviluppano colonie lisce, verdi (saccarosio negative), con diametro di 2-3 mm.

L'identificazione completa a livello di specie dei microrganismi coltivati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

### 11-CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>V. furnissii</i> ATCC 11128	37°C / 18 h / A	buona crescita
<i>V.parahaemolyticus</i> ATCC 17802	37°C / 18 h / A	buona crescita

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrate di American Type Culture Collection

### 12 - VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti del terreno in polvere Alkaline Peptone Water viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato.

La produttività e la selettività sono testate con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di ceppi target e non-target in provette, incubando a 35-37°C per 18-24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel Lotto di riferimento ( $G_{FRB}$ ) e nel Lotto di prova ( $G_{FTB}$ ). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *V.furnissii* ATCC 11128, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; la selettività è testata con i seguenti ceppi non-target: *E.coli* ATCC 25922, *E.aerogenes* ATCC 13048, *E.faecalis* ATCC 19433, *S.aureus* ATCC 25923, *P.mirabilis* ATCC 25933. I ceppi target crescono molto bene e l'indice di produttività  $G_{FRB}/G_{FTB}$  per ciascun ceppo in esame è  $\leq 1$ . Poiché la selettività del terreno è molto limitata, i ceppi non target mostrano comunque una crescita dopo l'incubazione.

### 13-LIMITI DEL METODO

- Per migliorare il recupero di *V. vulnificus*, è stato dimostrato efficace il terreno contenente derivati di cellobiosio-polimixina B-colistina e cellobiosio-colistina.<sup>2</sup>
- *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* possono essere presenti in bassa carica nei campioni e sono spesso accompagnati da un numero molto maggiore di altri microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Vibrionaceae* o ad altre famiglie.<sup>2</sup>
- Sebbene la destinazione d'uso ed il metodo d'impiego del terreno qui descritto fanno riferimento alla ricerca di *Vibrio* negli alimenti e di conseguenza il prodotto non deve intendersi come un diagnostico *in vitro*, la letteratura riporta l'uso di Alkaline Peptone Water quale brodo di arricchimento nell'esame microbiologico delle feci per la ricerca dei vibriani.<sup>4</sup> Usare il terreno a concentrazione semplice, incubare a 35°C per 18 ore e trapiantare su piastra di TCBS Agar; occasionalmente i vibriani coltivano con incubazione più ridotta (6 ore) e per questi campioni incubazioni più prolungate causano una sovra crescita dei contaminanti che mascherano la presenza di *Vibrio* spp.<sup>5</sup> Le applicazioni in ambito clinico devono essere validate da parte dell'utilizzatore.

### 14-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è destinato ai controlli microbiologici, è per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli ante e post mortem degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

### 15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).





L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

### 16-BIBLIOGRAFIA

1. FDA (1995) Bacteriological Analytical Manual, Chapter 9, Vibrio, May 2004. Content current as of:10/31/2017
2. ISO 21872 (2017) Microbiology of the food chain — Horizontal method for the determination of Vibrio spp. —Part 1: Detection of potentially enteropathogenic Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae and Vibrio vulnificus.
3. FAO/WHO. 2001, Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of Campylobacter spp. in broiler chickens and Vibrio spp. in seafood, a joint FAO/WHO expert consultation, Geneva, Switzerland, 23–27 July 2001.
4. M.Lesmana et al. (1985) An evaluation of Alkaline Peptone Water for enrichment of Vibrio cholera in feces. Southeast Asian J. Trop. Med Pub. Healt. 16, 265.
5. Tarr C.L., Bopp C.A., Farmer III J.J. Vibrios and Related Organisms. In Manual of Clinical Microbiology, 11th ed. 2015, ASM Press.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 8	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2022

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

