

AZIDE DEXTROSE BROTH

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in provetta



Azide Dextrose Broth; da sinistra: provetta non inoculata e provetta con *Enterococcus faecium*.

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per la determinazione degli streptococchi fecali/enterococchi nelle acque, negli alimenti congelati, nel latte ed in altri campioni

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Peptocomplex	15,0 g
Estratto di carne	4,5 g
Glucosio	7,5 g
Sodio cloruro	7,5 g
Sodio azide	0,2 g

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

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Gli enterococchi sono considerati il migliore indicatore della contaminazione delle acque reflue rispetto a *Escherichia coli* poiché sono più resistenti al cloro.

Azide Dextrose Broth è un terreno inizialmente formulato da Rothe¹ e sperimentato da Mullmann e Seligmann² per la determinazione quantitativa degli streptococchi nell'acqua, acque reflue, molluschi ed altri materiali con sospetta contaminazione fecale. Azide Dextrose Broth è stato utilizzato anche per l'isolamento degli streptococchi negli alimenti, latte, acqua ed in altri campioni di interesse sanitario come indicatori di contaminazione fecale.^{3,4}

Azide Dextrose Broth viene utilizzato per la determinazione presuntiva degli enterococchi nelle acque e nelle acque reflue utilizzando la tecnica MPN, seguita da un test di conferma in Bile Aesculin Azide Agar o Ethyl Violet Azide Broth.⁵⁻⁸

Una procedura simile è indicata nelle linee guida APAT, IRSA-CNR⁹ per la rilevazione degli enterococchi nelle acque con il metodo MPN. Il Peptocomplex e l'estratto di carne forniscono azoto, aminoacidi ed elementi in tracce per la crescita microbica; l'azide sodica limita la crescita dei batteri Gram negativi attraverso il blocco dell'enzima citocromo ossidasi; il glucosio è un carboidrato fermentabile; il sodio cloruro contribuisce al mantenimento dell'equilibrio osmotico del terreno.

4-PREPARAZIONE

Sospendere 34,7 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Scaldare fino a completo scioglimento, distribuire 10 mL in provette e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Per inoculi superiori a 1 mL per 10 mL di terreno, preparare il terreno a concentrazione doppia o multipla.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	paglierino, limpido.
pH (20-25°C)	7,2 ± 0,2

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Azide Dextrose Broth	Terreno di coltura in polvere	4011052	500 g (14,5 L)
Azide Dextrose Broth	Terreno pronto all'uso in provetta	551105	20 x 10 mL

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi, beute autoclavabili, anse da microbiologia, terreni di coltura ausiliari e reagenti per l'identificazione completa dei ceppi isolati.

8-CAMPIONI

Acqua potabile, acqua di sorgente, acque ricreative dolci e marine e campioni di alimenti. Fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni e operare in conformità alle buone pratiche di laboratorio.

9-PROCEDURA DELL'ANALISI

- Inoculare una serie di provette di Azide Dextrose Broth con quantità adeguate di un campione di 100 mL. Utilizzare volumi di campione di 10 mL o meno. La concentrazione del brodo deve essere proporzionale alle dimensioni del campione.
- Incubare a 35 ± 0,5°C per 24 ± 2 ore e osservare la crescita microbica (torbidità del brodo); se non si osserva torbidità, continuare l'incubazione per altre 24 ore.
- Strisciare una porzione di crescita da ciascuna provetta positiva su Bile Aesculin Azide Agar ISO Form. (REF 401018) e incubare a 35°C per 24 ± 2 ore.⁶
- In alternativa, prelevare 1 mL di brodocoltura dalle provette positive e inocularlo nelle provette corrispondenti contenenti Ethyl Violet Azide Broth (REF 401485) per il test di conferma. Incubare le provette a 35 °C per 24+24 (±3) ore.





10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di crescita batterica nelle provette di Azide Dextrose Broth è evidenziata dallo sviluppo di torbidità del brodo. Dopo test di conferma, applicare le tabelle MPN per la stima del numero di streptococchi fecali per unità volumetrica di campione.

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. È comunque responsabilità 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>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°C /24H-A	buona crescita
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	37°C /24H-A	buona crescita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C /24H-A	crescita inibita

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione in commercio, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Azide Dextrose Broth disidratato e pronto all'uso (TB: Test Batch) viene valutato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato. La produttività viene testata con il metodo della diluizione ad estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di ceppi target, incubando a 37°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto di prova (G_{TB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 19434, *E. hirae* ATCC 10541. L'indice di produttività $G_{RB} - G_{TB}$ per ciascun ceppo in esame deve essere ≤ 1 .

La selettività è testata con i seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 11778. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, la crescita di *E. coli* e *B. cereus* è totalmente inibita mentre quella di *S. aureus* è parzialmente inibita.

13-LIMITI DEL METODO

- Poiché in Azide Dextrose Broth crescono alcuni bacilli e cocci Gram positivi diversi dagli streptococchi fecali, è necessaria una prova di conferma.

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 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.
- Prestare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette pronte all'uso sono soggette a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni provetta di questo terreno di coltura è monouso.
- 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 i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza dei prodotti sono disponibili sul sito 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-

Terreno di coltura in polvere

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).

Provette pronto all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni le provette sono valide fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le provette estratte dal confezionamento secondario possono essere utilizzate sino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere usate immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare le provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

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 (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

















16- BIBLIOGRAFIA

1. Rothe (1948) Illinois State Health Department.
2. Mallmann WL, Seligmann A. comparative study of media for the detection of streptococci in water and sewage. Am J Public Health 1950; 40:286
3. Larkin, EP, Litsky, W, Fuller JE. Fecal streptococci in frozen foods I A bacteriological survey of some commercially frozen foods. Appl Microbiol 1955; 3:98-101
4. Splittstoesser DF, Wright R, Hucker GJ. Studies on Media for Enumerating Enterococci in Frozen Vegetables. Appl. Microbiol. 1962; 9:303.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985
6. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23rd ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
7. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, D.C. 1976
8. WHO Examination of water for pollution control. Part III: Biological, Bacteriological and Virological Examination., ed. Oxford. Pergamon Press, World Health Organization.1982
9. APAT, IRSA-CNR Manuali e Linee Guida 29/2003 Metodi analitici per le acque. Cap 3, 7040.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF or REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Proteggere dall'umidità	 Fragile, maneggiare con cura
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Lato superiore	 Proteggere dalla luce	 Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2022

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

