

AZIDE DEXTROSE BROTH (ROTHER)

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per la ricerca di enterococchi nelle acque e nelle acque reflue.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Peptone	20,0 g
Glucosio	5,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Dipotassio fosfato	2,7 g
Monopotassio fosfato	2,7 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

Azide Dextrose Broth (Rothe) è una versione tamponata del terreno inizialmente formulato da Rothe presso l'Illinois State Health Department.¹

Azide Dextrose Broth (Rothe) è incluso nel metodo APHA per la rilevazione degli enterococchi nell'acqua e nelle acque reflue.²

La presenza di enterococchi è un indicatore di contaminazione fecale principalmente nelle acque clorurate perché hanno una maggiore resistenza al cloro rispetto all'*Escherichia coli*.

Il peptone fornisce azoto, aminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica, il glucosio è un carboidrato fermentabile; la sodio azide limita la crescita dei batteri Gram-negativi bloccando l'enzima citocromo ossidasi; il cloruro di sodio contribuisce al mantenimento dell'equilibrio osmotico del mezzo; i fosfati di potassio tamponano il mezzo.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 35,6 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Scaldare delicatamente per sciogliere il terreno, distribuire 10 mL in provette e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Per inoculi superiori a 1mL per 10mL di terreno, preparare il terreno liquido a concentrazione doppia o multipla.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in provetta	Limpido, paglierino
pH (20-25 °C)	6,8 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Azide Dextrose Broth (Rothe)	Terreno di coltura in polvere	4011062	500 g (14 L)

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, anse, sterili, tamponi e pipette, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, beute Erlenmeyer, provette, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 – CAMPIONI

Acque, acque di scarico e altri campioni. Fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili per la raccolta di campioni di cibo e acqua. Operare in conformità con le buone pratiche di laboratorio per la raccolta, la conservazione e il trasporto

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

- Agitare energicamente il campione per garantire una distribuzione omogenea dei microrganismi in sospensione.
- Eseguire il conteggio in provette, secondo il metodo del numero più probabile (MPN); variare la dimensione dell'inoculo (multipli o frazioni di 1 ml) a seconda del tipo di campione, predisponendo almeno cinque provette per ogni diluizione.
- Incubare a 36 ±1°C per 24 ore e osservare la crescita microbica (torbidità del brodo); se non si osserva torbidità, continuare l'incubazione per altre 24 ore.
- Rimuovere 1 mL di brodo di coltura dalle provette positive e inoculare nelle provette corrispondenti contenenti Ethyl Violet Azide Broth (REF 401484) per il test di conferma.
- Incubare le provette a 36 ±1°C per 24+24 (±3) ore. Considerare positive le provette con torbidità accompagnata da un deposito grigio violaceo sul fondo della provetta.
- Per il test di conferma possono essere utilizzati altri terreni; consultare la bibliografia citata e altra letteratura applicabile.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita batterica in Azide Dextrose Broth (Rothe) è evidenziata dallo sviluppo di torbidità nel brodo.

Dopo i 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
E. faecalis ATCC 19433
E. coli ATCC 25922

INCUBAZIONE T° / T / ATM
 35-37°C /24H-A
 35-37°C /24H-A

RISULTATI ATTESI
 buona crescita
 inibito

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

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima della messa in vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Azide Dextrose Broth (Rothe) (TB) disidratati e pronti all'uso vengono valutati per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività è testata mediante il metodo di diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di organismi bersaglio in provette, incubando a 37°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento (GrRB) e nel lotto di prova (GrTB). La produttività è 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 GrRB-GrTB per ciascun ceppo di prova deve essere ≤ 1.

La selettività è testata con i seguenti ceppi non bersaglio: *Streptococcus* di gruppo B ATCC 12386, *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 inibito mentre la crescita di *S. aureus* e di *Streptococco* di gruppo B è parzialmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- Il metodo MPN con Azide Dextrose Broth (Rothe) non è applicabile all'acqua salata come specificato da APHA, per la quale è raccomandata la tecnica della membrana filtrante.
- Poiché alcuni bacilli e cocci Gram-positivi, diversi dagli streptococchi fecali, crescono in Azide Dextrose Broth (Rothe), è necessario un test di conferma in Ethyl Violet Azide Broth o altro terreno adatto

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.
- 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.
- 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 (provette/flaconi) e delle condizioni di conservazione.

16 - BIBLIOGRAFIA

- Rothe (1948) Illinois State Health Department.
- Greenberg A. E. et al (ed). (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. APHA, Washington, D.C.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o 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 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	08/2022

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

