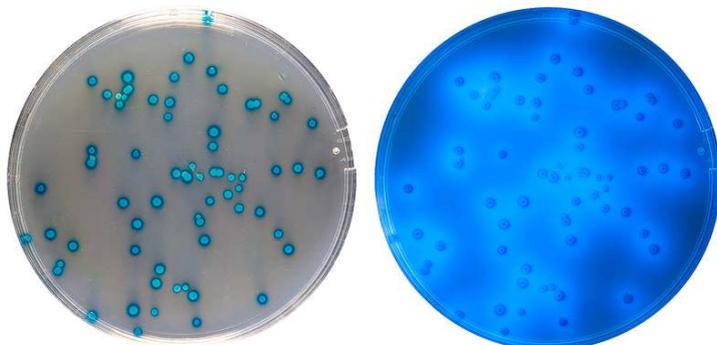


ChromArt

C-EC AGAR

Terreno in polvere e pronto all'uso



A sinistra: colonie di *E. coli* alla luce naturale;
a destra: la stessa piastra sotto lampada di Wood

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno cromogeno e fluorogeno per la rilevazione simultanea dei coliformi ed *Escherichia coli* nelle acque.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA*

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)

Triptosio	10.00 g
Triptofano	1.00 g
Peptocomplex	5.00 g
Estratto di lievito	3.00 g
Sodio cloruro	5.00 g
Sali biliari n. 3	1.50 g
Isopropil β-D-1-tiogalattopiranoside (IPTG)	0.10 g
5-Bromo-4-cloro-3-indolil beta-galattoside (X-GAL)	0.08 g
4-Metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG)	0.05 g
Agar	13.00 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'inquinamento fecale è la causa principale delle malattie trasmesse dall'acqua, poiché la maggior parte degli agenti patogeni associati alla trasmissione risiede nelle feci umane e degli animali a sangue caldo. L'esame di campioni di rilevanza sanitaria per la presenza di *E. coli* e batteri coliformi fornisce un'indicazione di tale inquinamento.

Il terreno C-EC Agar consente la determinazione quantitativa simultanea dei coliformi totali e di *E. coli* con incubazione a 37°C per 18-24 ore, oppure il conteggio di *E. coli* e coliformi fecali con incubazione a 44°C. Il terreno C-EC Agar è incluso nelle linee guida APAT per l'analisi delle acque.¹

Il triptosio ed il peptocomplex forniscono azoto, carbonio, aminoacidi e minerali per la crescita microbica; l'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il piruvato di sodio stimola una rapida crescita batterica e favorisce il recupero delle cellule stressate. I sali biliari no. 3 inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi.

La rilevazione dei batteri coliformi si basa sulla capacità della β-D-galattosidasi di scindere il substrato X-GAL con la formazione di colonie blu-verdi. L'enumerazione di *E. coli* si basa sulla rilevazione della β-D-glucuronidasi, oltre che della β-D-galattosidasi, che scinde il substrato fluorogeno MUG, con la formazione di colonie blu scuro, fluorescenti alla lampada di Wood. L'idrolisi di X-GAL è potenziata dall' IPTG, un induttore dell'operone del lattosio. Con il test dell'indolo si può confermare la presenza di *E. coli*, aggiungendo una goccia di reagente di Kovacs alle colonie.

Il C-EC Agar è stato uno dei primi terreni di coltura cromogeni proposti all'inizio degli anni '90 per l'isolamento e la differenziazione microbica ed è stato oggetto di prove sperimentali pubblicate da Bonadonna *et al.*^{2,3}, Jermini *et al.*⁴, Cesaroni *et al.*⁵

4A- PREPARAZIONE (TERRENO IN POLVERE)

Sospendere 38,8 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente fino a completa soluzione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

4A- PREPARAZIONE (TERRENO IN FLACONE)

Liquefare il contenuto del flacone in autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnomaria a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un recipiente con acqua, posto su una piastra riscaldante e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno di coltura in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto del terreno disidratato
Aspetto del terreno in piastra
pH finale (20-25°C)

polvere omogenea, fine, di colore beige
giallo chiaro, limpido o leggermente opalescente.
7.4 ± 0.2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
C-EC Agar	Terreno in polvere	4012982	500 g (12.9 L)
C-EC MF Plate	Piastre pronte	497101	3 x 10 piastre ø 55 mm
C-EC Agar	Flaconi pronti	5112982	6 x 100 mL

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia e pipette sterili, apparato e membrane per la filtrazione dei campioni, terreni di coltura e reagenti accessori.

8 - CAMPIONI

Campioni di acqua. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio e fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Filtrare 100 mL di campione (o altri volumi, ad esempio 250 mL per l'acqua in bottiglia) utilizzando un filtro a membrana di circa 47 mm o 50 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro nominale dei pori di 0,45 µm e, preferibilmente, con



griglia. Il volume minimo per la filtrazione è di 10 mL di campione o di sue diluizioni per garantire una distribuzione uniforme dei batteri sul filtro a membrana.

Dopo la filtrazione, posizionare il filtro su C-EC Agar, assicurandosi che non rimanga dell'aria sotto alla membrana.

Capovolgere la piastra ed incubare a 36 ± 1 °C per 18-24 ore (rilevamento di *E. coli* e coliformi) o a 44 ± 1 °C per 18-24 ore per il rilevamento di *E. coli* e coliformi fecali.¹

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie alla luce naturale e sotto la lampada di Wood in ambiente semi-buio.

- Contare le colonie blu-verdi (positive alla reazione della β -D-galattosidasi) come batteri coliformi o coliformi fecali presunti (a seconda della temperatura di incubazione).
- Contare le colonie blu-verdi (positive alla β -D-galattosidasi) e fluorescenti alla lampada di Wood (positive alla β -D-glucuronidasi) come *E. coli*. La conferma dell'identificazione di *E. coli* può essere effettuata con il test dell'indolo (+), direttamente sulla piastra con il Reagente di Kovacs (REF 19171000).

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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 facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE	SPECIFICHE
	T° / T / ATM	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C/ 18-24H/A	crescita, colonie verde-blu, fluorescenti sotto lampada di Wood
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	37°C/ 18-24H/A	crescita, colonie rosa, non fluorescenti sotto lampada di Wood
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	37°C/ 18-24H/A	crescita, colonie incolori
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°C/ 18-24H/A	inibito

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di C-EC Agar disidratato e pronto per l'uso vengono sottoposti a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739: le piastre di C-EC Agar vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 37°C per 24 ore. Le colonie vengono enumerate sul lotto di prova (TB) e sul lotto di riferimento (RB) e viene calcolato il rapporto di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Se $Pr \geq 0,7$, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. Le colonie di *E. coli* sono blu-verdi, fluorescenti alla lampada di Wood e positive all'indolo.

Inoltre, la produttività è valutata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target: *C. freundii* ATCC 43864 ed *E. aerogenes* ATCC 13048. Dopo l'incubazione, vengono valutate l'entità delle crescite e le caratteristiche delle colonie: i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie blu-verdi, non fluorescenti alla lampada di Wood.

La specificità viene testata con tecnica semiquantitativa con *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, *P. aeruginosa* cresce con colonie verde pallido/incolore.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con gocce di adeguate diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland del ceppo Gram positivo *E. faecalis* ATCC 19433. La crescita del ceppo non-target è totalmente inibita.

13-LIMITI DEL METODO

- È stato riportato che circa il 40% delle specie di *Shigella*, vari bio-sierotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* sottogenere I) possono essere positivi alla β -glucuronidasi; solo eccezionalmente questo test è positivo con ceppi di *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).⁶⁻⁸
- Circa il 3-4% di *E. coli* è negativo alla β -glucuronidasi, in particolare i ceppi di *E. coli* O157.^{9,10} Di conseguenza, questi ceppi, essendo positivi alla β -galattosidasi, cresceranno con colonie blu-verdi non fluorescenti e saranno contati come coliformi.
- Oltre ad esprimere la β -D-glucuronidasi, *E. coli* è in grado di produrre indolo dal triptofano. Pertanto, in caso di dubbio sulla presenza di colonie di *E. coli* sul terreno di coltura, può essere utilizzato come ulteriore conferma il test dell'indolo.⁹
- Per evitare risultati falsi positivi, causati da batteri ossidasi positivi, ad esempio *Aeromonas* spp, le colonie dei presunti coliformi devono essere confermate con il test dell'ossidasi (negativo) (Oxidase Test Strips, REF 191040ST).
- Si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, a partire da colture pure, per una completa identificazione.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per 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 disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione all'apertura dei flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno in flacone. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.





- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- I flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere o con i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, 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 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 dei prodotti, 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

Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

Flaconi pronti all'uso

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

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +2°C / +8°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. APAT, IRSA-CNR. Metodi analitici per le acque. Volume Terzo, Sezione 7000 - Determinazione di microorganismi. APAT Manuali e Linee Guida 29/2003.
2. Bonadonna L, Chiaretti G, Coccia AM, Semproni M. Valutazione comparativa di procedure analitiche per il rilevamento di Enterobacteriaceae in acque marine costiere. ISSN 1123-3117, Rapporti ISTISAN 97/3.
3. Bonadonna L, Villa L. Un substrato cromogeno per l'isolamento dei coliformi totali nelle acque: il C-EC-MF Plate. Notiziario. Metodi Analitici per le Acque, Anno 13, N. 1, 1993.
4. Jermine M, Domeniconi F, Jaeggli M. 1994. C-EC-Agar, a Modified mFC-Agar for the Simultaneous Enumeration of Fecal Coliforms and E. coli in water samples. Letters App Microbiol. 1994; 19: 332-335.
5. Cesaroni D, Felicori M, Marcon A, Piscolla F, Bertaccini E, Biserni R, Cirillo G, Gironi A. Valutazione preliminare di un nuovo substrato colturale per la determinazione dei coliformi e di E coli nelle acque. Convegno Microbiologia Alimentare: Aspetti Analitici e Legislativi - Bologna 25/2/1993.
6. Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl-D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of E. coli. J Clin Microbiol 1984; 19 :172.
7. Robison BJ. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 48:285-288
8. Kaluzewski SD, Tomczuk D. Evaluation of the Usefulness of Tests for Production of Beta-D-glucuronidase and Propylene Glycol Utilization for the Differentiation of Enterobacteriaceae Rods. Med Dosw Mikrobiol, 1995; 47:155-68.
9. ISO 9308-1:2014 Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
10. Robison BJ. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 48:285-288

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF or REF Catalogue number	LOT Batch code	Manufacturer	This side up	Store in a d place	Fragile
Temperature limitation	Content sufficient for <n> tests	Consult Instructions for Use	Use by	Keep away from direct light	For single use only

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2023

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

