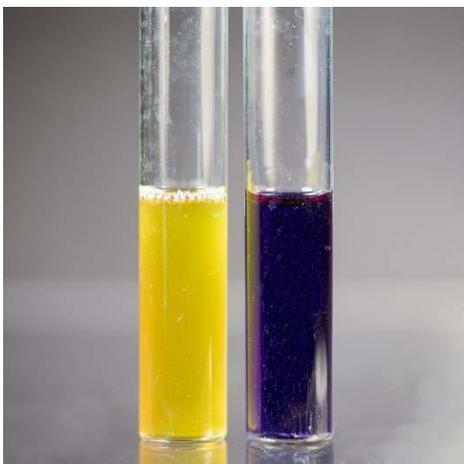


CRONOBACTER SCREENING BROTH BASE VANCOMYCIN CSB SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere, supplemento selettivo e provette pronte all'uso



Cronobacter Screening Broth : a sinistra provetta con crescita di *Cronobacter sakazakii*. A destra provetta non inocolata.

1 – DESTINAZIONE D'USO

Cronobacter Screening Broth Base, integrato con vancomicina, è utilizzato per l'arricchimento selettivo di *Cronobacter* spp. dai campioni della filiera alimentare, secondo ISO 22964.

2 – COMPOSIZIONE

CRONOBACTER SCREENING BROTH BASE (4013552)

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *	
Digerito enzimatico di tessuti animali	10,00 g
Estratto di carne	3,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Bromocresolo porpora	0,04 g
Saccarosio	10,00 g

VANCOMYCIN CSB SUPPLEMENT (4240057C)

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML)	
Vancomicina	5 mg

CHRONOBACTER CREENING BROTH (551355)

Digerito enzimatico di tessuti animali	10,00 g
Estratto di carne	3,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Bromocresolo porpora	0,04 g
Saccarosio	10,00 g
Vancomicina	10 mg
Acqua purificata	1000 mL

* Le formule possono essere adattate e/o integrate per soddisfare i criteri di prestazione richiesti.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Le specie *Cronobacter* (precedentemente note come *Enterobacter sakazakii*) sono batteri patogeni Gram-negativi a forma di bastoncino, mobili, della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Questi microrganismi sono considerati patogeni opportunisti legati a infezioni pericolose per la vita soprattutto nei neonati.¹ Le sindromi cliniche dell'infezione da *Cronobacter* comprendono l'enterocolite necrotizzante (NEC), la batteriemia e la meningite, con tassi di mortalità compresi tra il 40 e l'80%.^{1,2} Il batterio è stato isolato da una serie di fonti alimentari tra cui alimenti a base di latticini, carni essiccate, acqua, riso e altri.^{1,3,4}

Cronobacter Screening Broth Base, addizionato con vancomicina, è un terreno di arricchimento selettivo utilizzato per la procedura di determinazione della presenza o dell'assenza di *Cronobacter* spp. in campioni provenienti dalla filiera alimentare, secondo ISO 22964.⁵ Questo terreno deve essere utilizzato in combinazione con Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar.

Il digerito enzimatico dei tessuti animali e l'estratto di manzo forniscono azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il saccarosio è un carboidrato fermentabile mentre il porpora di bromocresolo è un indicatore di pH: i batteri che fermentano il saccarosio acidificano il terreno con un cambiamento di colore del porpora di bromocresolo da porpora a giallo. L'agente selettivo del terreno è la vancomicina che inibisce la crescita dei batteri Gram-positivi.

4 – PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 14 g in 500 mL di acqua purificata fredda; riscaldare agitando frequentemente se necessario e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Raffreddare al di sotto dei 47°C e aggiungere, in condizioni di asepsi, il contenuto di una fiala di Vancomycin CSB Supplement (REF 4240057C) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e distribuirne 10 mL in provette sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallo chiaro
Aspetto della soluzione e del terreno in provetta	viola, trasparente
Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa alta e soffice, limpido e incolore dopo ricostituzione
pH (20-25 °C)	7,4 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Cronobacter Screening Broth Base	Terreno in polvere	4013552	500 g (17,8 L)
	Provette pronte all'uso	551355	20 x 10 mL
Vancomycin CSB Supplement	Supplemento liofilo	4240057C	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.



8 – CAMPIONI

Prodotti alimentari e ingredienti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali; campioni ambientali nel settore della produzione alimentare e della manipolazione degli alimenti. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.⁵

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare il campione da testare secondo le istruzioni della norma ISO 6887 relativa al prodotto in questione.

Aggiungere 10 g o 10 mL di campione a 90 mL di Buffered Peptone Water (REF 401278). Per inoculo superiore a 10 g preriscaldare il brodo a 34-38°C.

Incubare il brodo di pre-aricchimento a 36 ± 2 °C per 18 ± 2 ore.

Trasferire 0,1 mL di brodo pre-aricchito in 10 mL di Cronobacter Screening Broth completo.

Incubare le provette del brodo di arricchimento a $41,5 \pm 1$ °C per 24 ± 2 ore.

Strisciare un'ansa di brodo di arricchimento incubato (circa 10 µL) su una piastra di CCI Agar e incubare capovolta a $41,5 \pm 1$ °C per 24 ± 2 ore.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita batterica in Cronobacter Screening Broth è evidenziata dallo sviluppo di torbidità nel brodo; le colonie di *Cronobacter* spp. tipicamente fanno virare il terreno al giallo.

Dopo l'incubazione delle piastre di CCI Agar, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie.

Le colonie tipiche di *Cronobacter* sono di dimensioni da piccole a medie (da 1 mm a 3 mm) e di colore da blu a blu-verde.

Su CCI Agar possono svilupparsi colonie di batteri Gram-negativi atipici con le seguenti caratteristiche: bianche, con o senza centro grigio, nero o verde; alcune colonie naturalmente pigmentate di non-*Cronobacter* possono apparire gialle o rosse.

Eseguire i test di conferma sulle colonie tipiche come riportato da ISO 22964.⁵

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, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi utili per il controllo qualità.⁵

CEPPO DI CONTROLLO

C. *sakazakii* ATCC 29544+S. *aureus* ATCC 25923
C. *muytjensis* ATCC 51329+S. *aureus* ATCC 25923
S. *aureus* ATCC 25923

INCUBAZIONE T° / T / ATM

41.5 °C ± 1°C /24 h ± 2 h / A
41.5 °C ± 1°C /24 h ± 2 h / A
41.5 °C ± 1°C /24 h ± 2 h / A

RISULTATI ATTESI

crescita, il terreno vira al giallo
crescita, il terreno vira al giallo
inibito

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

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Cronobacter Screening Broth Base disidratato addizionato con Vamcomycin CSB Supplement viene testato per la produttività e la selettività con incubazione a 41,5°C per 24 ore, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 ml di diluizioni decimali appropriate di organismi target in provette, incubando a 41,5°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: *C. sakazakii* ATCC 29544 e *C. muytjensis* ATCC 51329. L'indice di produttività $G_{RB}-G_{TB}$ per ciascun ceppo in esame deve essere ≤ 1 .

La produttività e la selettività sono testate insieme a miscele di diluizioni appropriate di ceppi target e non target: *C. sakazakii* ATCC 29544 + *S. aureus* ATCC 25923 e *C. muytjensis* ATCC 51329 + *S. aureus* ATCC 25923. Dopo l'incubazione delle provette inoculate e la subcoltura su piastre CCI Agar, i ceppi target mostrano una crescita predominante sul terreno di coltura (>10 colonie blu-verdi).

La selettività viene testata con il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi non target in provette e registrando la diluizione più alta che mostra crescita dopo la subcoltura in Tryptic Soy Agar. La crescita dei ceppi non target testati *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 e *B. subtilis* ATCC 6633 è totalmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- Cronobacter* può essere presente in quantità ridotte nei campioni, insieme ad altre *Enterobacteriaceae*, come *E. cloacae*, che possono interferire nella determinazione del microrganismo target.⁵
- L'utilizzo di campioni di grandi dimensioni può compromettere il recupero di *Cronobacter* spp. quando sono presenti microflora interferenti, come i probiotici⁵

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Vancomycin CSB Supplement è classificato come pericoloso secondo la normativa vigente. 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.





- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette pronte all'uso sono soggette a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere, i supplementi ed i ceppi microbici..
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi 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**Provette pronte all'uso**

Dopo il ricevimento, conservare a +2 / +8°C al riparo della luce, in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento.

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°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).

Supplemento liofilizzato

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. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

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). Secondo ISO 22964⁵ la base del terreno in provette o beute può essere conservata a +2°C +8°C fino a sei mesi; le provette complete di vancomicina possono essere conservate a 5 °C ± 3 °C per 1 giorno.

16- BIBLIOGRAFIA

1. Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. Cronobacter species (formerly known as Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium, J App Microbiol 2012; 113:1-15
2. Friedemann, M. Epidemiology of invasive neonatal Cronobacter (Enterobacter sakazakii) infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28:1297–1304.
3. Bowen AB, Braden CR. Invasive Enterobacter sakazakii disease in infants. Emerg Infect Dis 2006;12:1185-89.
4. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, Callanan JJ, Fanning, S (2010) Cronobacter (Enterobacter sakazakii): an opportunistic foodborne pathogen. Foodborne Pathog Dis 2010; 7:339-50.
5. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of Cronobacter spp.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	Non riutilizzare

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2023
Revisione 4	Aggiunta delle provette pronte all'uso	02/2025

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

