

EC BROTH

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per la fase di conferma nelle procedure di ricerca e conteggio di *Escherichia coli* e coliformi fecali negli alimenti e nelle acque.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Triptone	20,0 g
Lattosio	5,0 g
Potassio fosfato bibasico	4,0 g
Potassio fosfato monobasico	1,5 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sali biliari n. 3	1,5 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Escherichia coli (EC) Broth è stato introdotto per la prima volta da Hajna e Perry per migliorare il rilevamento selettivo dei batteri coliformi e il rilevamento presuntivo di *E. coli* in acqua, alimenti, crostacei, latte e altri materiali.^{1,2}

EC Broth è consigliato:

- da ISO 7251³ per il test di conferma MPN nella procedura per il rilevamento e il conteggio di *E. coli* negli alimenti,
- da FDA-BAM4 per il test di conferma MPN per coliformi fecali (termotolleranti) ed *E. coli* negli alimenti, nell'acqua di mare e nei molluschi,
- da APHA⁵ per il test di conferma su campioni di acqua.

Le provette EC Broth sono inoculate con brodo da provette presunte positive di Lauryl Sulphate Broth e incubate a 44°C (per *E. coli* secondo ISO 7252)³ o a 44,5 ± 0,2°C (per coliformi termotolleranti ed *E. coli* secondo ISO 7252)³ o a 44,5 ± 0,2°C (per coliformi termotolleranti ed *E. coli* secondo FDA-BAM e APHA)^{4,5}, per 24 ± 2 h. Se viene prodotto gas, il test è positivo, indicando la presenza di coliformi termotolleranti o *E. coli*.

Il triptone fornisce azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica; il lattosio è un carboidrato fermentabile. I fosfati fungono da sistema tampone e il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. I sali biliari n° 3, inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi, in particolare bacilli ed enterococchi.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 37 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Scaldare leggermente per sciogliere completamente la polvere, mescolare bene e distribuire in aliquote da 10 mL in provette contenenti una provetta di Durham capovolta. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. I tubi Durham non devono contenere bolle d'aria dopo la sterilizzazione.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in flacone e in piastra	giallo chiaro, limpido
pH finale (20-25 °C)	6,8 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
EC Broth	Terreno di coltura in polvere	4014252	500 g (13,5 L)
EC Broth	Provette pronte all'uso	551425	20 x 10 mL con provette di Durham

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette, provette Durham, terreni di coltura ausiliari e reagenti.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione degli alimenti.³ Alimenti, acqua di mare e molluschi.⁴ Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento alle Norme e regolamenti internazionali.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Per il test di conferma di *E. coli*/coliformi fecali procedere come segue:

Da ciascuna delle provette incubate con Lauryl Pepto Bios Broth a concentrazione singola e doppia (REF 401580) che mostra opacità, torbidità o qualsiasi gas visibile, inoculare con un'ansa da campionamento una provetta di EC Broth.

Incubare le provette a 44 °C ± 1°C³ (o 44,5 ± 0,2°C)⁴ per 24 h ± 2 h.

Se, in questa fase, non è presente gas visibile nel brodo EC, prolungare l'incubazione fino a un totale di 48 h ± 2 h. Per i molluschi vivi, il tempo totale di incubazione è limitato a 24 ore ± 2 ore.³

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il terreno diventa torbido quando i batteri crescono; la formazione di gas può essere osservata mentre la produzione di bolle si accumula nei tubi di Durham.

Considerare positive per i batteri coliformi fecali le provette di Brodo EC con produzione di gas.⁴

Si considerino positive per batteri *E. coli* le provette EC Broth con produzione di gas, e che a 44°C producono indolo da triptofano.³



11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	44°C/24-48 H/A	crescita con produzione di gas
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	44°C/24-48 H/A	inibito

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di EC Broth disidratato e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 44°C per 24-48 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita e la produzione di gas nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto da testare (G_{TB}).

La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *E. coli* ATCC 25925 e *E. coli* ATCC 8739. L'indice di produttività $G_{RB}-G_{TB}$ per ogni ceppo target è ≤ 1 e le provette presentano gas nelle provette Durham.

La specificità è testata con diluizioni appropriate del ceppo non target *S. Typhimurium* ATCC 14028. Dopo l'incubazione, il ceppo mostra una buona crescita senza produzione di gas.

La selettività è testata con opportune diluizioni (≥ 10.000 CFU/proveta) dei ceppi non target *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo incubazione a 44°C per 48 ore delle provette inoculate, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibito.

13 – 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 tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Ogni provetta di questo terreno di coltura è monouso.
- Le provette pronte all'uso di EC Broth 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 ed 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.

14 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

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).

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).

In accordo a FDA-BAM, il brodo EC preparato può essere conservato in frigorifero fino a 1 mese in provette con tappo a vite.

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).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Hajna AA, Perry CA. Comparative study of presumptive and confirmative media for bacteria of the coliform group and for fecal streptococci. Am J Public Health 1943; 33:550-556.
2. Perry CA, Hajna AA. Further evaluation of EC medium for the isolation of coliform bacteria and Escherichia coli. Am. J. Public Health 1944; 34:735-738.
3. ISO 7251:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli — Most probable number technique





- FDA-BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Content current as of:10/09/2020
- APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd ed. 2017.

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	 Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	2023/01

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

