

# ENDO BROTH MEMBRANE FILTER

## (m-ENDO BROTH)

### Terreno di coltura in polvere

#### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la rilevazione e la differenziazione di coliformi e altri batteri enterici Gram-negativi.

#### 2 – COMPOSIZIONE

##### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA \*

Tryptone	5,000 g
Peptone	5,000 g
Triptosio	10,000 g
Estratto di lievito	1,500 g
Lattosio	12,500 g
Sodio cloruro	5,000 g
Potassio fosfato bibasico	4,375 g
Potassio fosfato monobasico	1,375 g
Sodio solfito	2,100 g
Sodio desossicolato	0,100 g
Sodio lauril solfato	0,050 g
Fucsina basica	1,050 g

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

#### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I terreni Endo sono stati originariamente sviluppati da Endo<sup>1</sup> per l'isolamento del bacillo del tifo. McCarthy, Delaney e Grasso<sup>2</sup> hanno modificato la formulazione di Endo e proposto il terreno Endo LES (Lawrence Experimental Station), per il recupero dei coliformi con una tecnica a due fasi con filtro a membrana.

Le procedure con filtro a membrana sia ad una che a due fasi sono state incluse nei metodi standard APHA per il rilevamento dei coliformi nelle acque potabili, non potabili e di altro tipo.<sup>3</sup>

Endo Broth Membrane Filter (m-Endo Broth) ha una formulazione con gli stessi componenti di LES Endo Agar, a concentrazioni leggermente diverse e senza agar.

In m-Endo Broth, i fattori di crescita essenziali sono forniti dai peptoni che sono fonti di azoto, carbonio e minerali. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. I fosfati sono usati come agenti tampone per controllare il pH nel terreno. Il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico. La leggera inibizione dei batteri Gram-positivi ottenuta con la combinazione solfito di sodio/fucsina acida nella classica formulazione Endo, è stata migliorata nella formulazione "Endo Broth" mediante l'inclusione di sodio desossicolato e sodio lauril solfito. Il solfito di sodio nel mezzo ha anche la funzione di decolorare la fucsina acida come nel reattivo di Schiff. I batteri fermentanti il lattosio producono acetaldeide dal lattosio che libera la fucsina dal composto incolore fucsina-solfito e colora le colonie di rosso; quando la reazione è rapida e molto intensa (es. nel caso di *E. coli*), la fucsina cristallizza e produce una lucentezza metallica sulle colonie. Nelle aree della piastra con crescita intensa, la lucentezza del metallo viene soppressa. I microrganismi non fermentanti il lattosio producono colonie incolori sullo sfondo rosa del terreno.

#### 4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 48 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Aggiungere 20 mL di etanolo al 95%, portare ad ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente. Non sterilizzare in autoclave, non bollire eccessivamente. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene per risospendere il precipitato.

#### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, viola con piccoli granelli neri
Aspetto del terreno in flacone e in piastra	rosa-arancio, leggermente opalescente con piccoli granelli neri
pH finale (20-25 °C)	7,2 ± 0,2

#### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
m- Endo Broth	Terreno di coltura in polvere	4014612	500 g (10,41 L)

#### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre di Petri, etanolo al 95%, sistema di filtrazione a membrana, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

#### 8 – CAMPIONI

Acqua. Consultare i riferimenti appropriati per la raccolta, la conservazione e la preparazione dei campioni.<sup>3</sup>

#### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

##### Tecnica a un passaggio<sup>3</sup>

1. Posizionare un tampone assorbente in una piastra Petri da 55 mm e pipettare almeno 2-3 mL di m-Endo Broth per saturare il tampone.
2. Utilizzando un'unità di filtrazione sterile appropriata, filtrare il campione d'acqua.
3. Posizionare con le precauzioni dell'asepsi la membrana filtrante sul tampone evitando la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie del tampone.
4. Incubare a 35°C per 22-24 ore.

##### Tecnica in due passaggi<sup>3</sup>

1. Posizionare un tampone assorbente in una piastra Petri da 55 mm e pipettare almeno 2 mL di Lauryl Pepto Bios Broth (REF 401580) per saturare il tampone.





- Utilizzando un'unità di filtrazione sterile appropriata, filtrare il campione d'acqua, posizionare con le precauzioni dell'asepsi la membrana filtrante sul tampone e incubare per 1,5 - 2 ore a 35°C in atmosfera umida.
- Trasferire la membrana dal tampone alla piastra Petri da 55 mm contenente un tampone saturato con almeno 2-3 mL di m-Endo Broth, evitando la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie dell'agar. Incubare a 35°C per 22-24 ore.

### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le tipiche colonie di coliformi vanno dal rosa al rosso con riflessi metallici dorati. La lucentezza può coprire l'intera colonia o può apparire solo al centro o alla periferia.

Alcune colonie appariranno rosa o rosse ma prive della caratteristica lucentezza metallica. Queste colonie sono classificate come coliformi atipici e devono essere verificate mediante ulteriori test.

Le tipiche colonie non fermentanti il lattosio sono incolori sullo sfondo rosa del terreno

### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente finale può 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C/24H-A	buona crescita, colonie rosa-rosso con riflessi metallici
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	37°C/24H-A	buona crescita, colonie incolori

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 m-Endo Broth disidratato (TB) e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato (RB). La produttività è testata con metodo quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 ed *E. aerogenes* ATCC 13048: le membrane filtranti sulle piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 37°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività ( $Pr:CFU_{TB}/CFU_{RB}$ ). Se  $Pr \geq 0,7$  e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie rosa-rosse con riflessi metallici) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Inoltre, le caratteristiche di produttività e specificità sono testate mediante tecnica ecometrica semi-quantitativa con i seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 8739, *K. pneumoniae* ATCC 23357 e *S. Enteritidis* ATCC 13086. Dopo l'incubazione, la quantità di crescita e le caratteristiche della colonia vengono valutate: i ceppi di coliformi mostrano una buona crescita con colonie rosa-rosse con lucentezza metallica mentre *S. Enteritidis* cresce con colonie incolori.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato in superficie inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione McFarland 0,5 di *S. aureus* ATCC 25923 ed *E. faecalis* ATCC 19433. La crescita dei ceppi Gram-positivi è totalmente inibita.

### 13 – LIMITEI DEL METODO

- Occasionalmente, i microrganismi non coliformi possono produrre tipiche colonie brillanti.
- Occasionalmente, alcune colonie appariranno rosa o rosse ma prive della caratteristica lucentezza metallica. Queste colonie sono classificate come coliformi atipici e devono essere verificate con ulteriori test.

### 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 in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda 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](http://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.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi 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 qui descritto 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](http://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

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'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida












della loro durata di conservazione, in base al tipo e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo l'APHA, il terreno in flacone può essere conservato a +2- +8°C al buio, fino a un massimo di 96 ore.<sup>3</sup>

### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. Endo S. Über ein Verfahren zum Nachweis der Typhus bacillen. Centr f Bakt 1904; 35:109-110.
2. McCarthy JA, Delaney JE, Grasso RJ. Measuring coliforms in water. Water Sewage Works 1961; 108:238
3. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd ed., 2017. American Public Health Association, Washington, D.C.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

<b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	<b>LOT</b> Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

