

**ChromArt**

ENTEROBACTER SAKAZAKII ISOLATION AGAR (ESIA)

Terreno in polvere, piastre pronte all'uso.

ESIA: colonie blu: *Cronobacter sakazakii*;
colonie bianche: *Salmonella* Enteritidis.**1 - DESTINAZIONE D'USO**Terreno selettivo cromogeno per la ricerca di *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii* negli alimenti.**2 - COMPOSIZIONE****FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)***

Peptone	7,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Sodio desossicolato	0,60 g
Violetto cristallo	0,002 g
X α-glucoside	0,150 g
Agar	15,00 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Cronobacter sakazakii (in precedenza denominato *Enterobacter sakazakii*) è un bastoncino Gram negativo, classificato in passato come variante pigmentata di giallo di *Enterobacter cloacae*. E' un patogeno coinvolto in meningiti, sepsi ed enterocoliti necrotizzanti in neonati immaturi o immunocompromessi con elevati tassi di mortalità. E' altresì responsabile di infezioni nosocomiali.¹

Le patologie sono state associate al consumo di preparati per neonati in polvere a base di latte o di soia, contaminati da *Cronobacter*.^{2,3} Episodi di infezioni sono stati segnalati nelle unità di terapia intensiva neonatale in Canada, USA, UK, Grecia, Olanda.

Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA) è un terreno selettivo per Gram negativi contenente un composto cromogeno per la differenziazione di *Cronobacter sakazakii* che coltiva con colonie blu.

L'impiego di Buffered Peptone Water come arricchimento non selettivo, di mLST Broth (401476) come arricchimento selettivo e del terreno d'isolamento ESIA, consentono la ricerca specifica *C.sakazakii* nei campioni alimentari in particolare nel latte in polvere o in prodotti preparati con latte in polvere. Il terreno ESIA e la procedura di lavoro qui descritta sono in accordo alla norma ISO/TS 22964:2006⁴, sostituita dallo Standard ISO 22964:2017.⁵

4 - PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 30,8 g in 1000 ml di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione, autoclavare a 121°C per 15 minuti; raffreddare a 45-50°C e distribuire in piastre Petri sterili

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto del terreno disidratato:	polvere fine di colore viola tenue
Aspetto del terreno in piastra:	viola tenue, limpido.
pH finale del terreno a 25 °C :	7,0 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)	Terreno in polvere	4014782	500 g (16,2 L)
Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)	Piastre pronte all'uso	541478	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane; confezionamento secondario: scatola di cartone

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, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Latte in polvere, latte in polvere per neonati e campioni ambientali nell'ambito della produzione e della manipolazione degli alimenti. 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

- Sospendere il campione in esame in Buffered Peptone Water (REF 401278C o 401278) in rapporto 1:9 (es. 25 g di campione in 225 ml di BPW).
- Incubare a 37 ± 1°C per 18 ± 2 ore.





- Eseguire una subcoltura di 0,1 ml dal brodo BPW in una provetta contenente 10 ml di mLST Broth (REF 401476).
- Incubare a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.
- Facendo uso di un'ansa trapiantare 10 μl dal brodo mLST su una piastra di ESIA ed incubare a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica cromatica e morfologica delle colonie.

Risultato positivo presuntivo per *C. sakazakii*: presenza di colonie verde-blu, con diametro da 1 a 3 mm

Risultato negativo per *C. sakazakii*: assenza di colonie tipiche verde-blu o presenza di colonie color malva

Confermare le colonie con i test biochimici raccomandati dalla norma ISO 22964

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 responsabilità 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.

Controllo della produttività - *C. sakazakii* buona crescita, colonie color verde-blu

Controllo della specificità - *Enterobacter gergoviae*: crescita scarsa, colonie color malva

Controllo della selettività - *S. aureus* ATCC 25923: inibito

Incubazione a 44°C per 24 ore.

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti del terreno ESIA in polvere e pronto all'uso vengono testati per la produttività, la specificità e la selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target: *C. sakazakii* CB CRO10.4, *C. muytjensii* ATCC 51329. Dopo incubazione a 44°C per 24 ore, i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie blu.

La specificità è valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con adeguate diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di 0,5 McFarland del ceppo *E. gergoviae* CB AES2.1. Dopo incubazione a 44°C per 24 ore, il ceppo mostra una buona crescita con colonie color malva/viola.

La selettività è testata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con adeguate diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non-target: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 14579. La crescita dei ceppi non-target è totalmente inibita.

CB: Collezione microbica Biolife.

13- LIMITI DEL METODO

- Alcuni coliformi coltivano su ESIA con colonie violetto, facilmente distinguibili dalle colonie blu di *C. sakazakii*.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono da impiegare per controlli microbiologici, sono per uso professionale e devono essere usati 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 le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in piastra qui descritti contengono 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 questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare i prodotti 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 nella preparazione del terreno.
- 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.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti 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

Terreno in polvere - Conservare a $+2^\circ\text{C}$ / $+8^\circ\text{C}$ 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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Piastre pronte all'uso - Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a $+2^\circ\text{C}$ / $+8^\circ\text{C}$ al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito ed alla temperatura indicata in etichetta. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le





piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Carol Iversen et al., The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies BMC Evol Biol. 2007; 7: 64.
2. Simmons BP et al. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1989; 10: 398.
3. Van Acker J et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *E.sakazakii* in powdered milk formula. J.Clin.Microbiol. 2001; 39:293-297.
4. ISO/TS 22694:2006 Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*
5. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Inserimento del capitolo "caratteristiche delle prestazioni", modifiche ai capitoli 8, 13 e 14	08/2022

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

