

## ETHYL VIOLET AZIDE (EVA) BROTH – LITSKY

### Terreno di coltura in polvere e terreno pronto all'uso



Ethyl Violet Azide Broth; da sinistra:  
tubo non inoculato e tubo con  
*Enterococcus faecalis*.

#### 1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per la ricerca di enterococchi nelle acque e altri campioni.

#### 2 – COMPOSIZIONE\*

(PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)

Triptosio	20,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Glucosio	5,0 g
Potassio fosfato bibasico	2,7 g
Potassio fosfato monobasico	2,7 g
Sodio azide	0,4 g
Violetto etile	0,83 mg

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

#### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Gli enterococchi sono considerati un miglior indicatore della contaminazione delle acque reflue rispetto all'*Escherichia coli* in quanto sono più resistenti al cloro.

Litsky et al.<sup>1,2</sup> hanno sviluppato un terreno selettivo contenente violetto di etile e sodio azide per la crescita specifica di enterococchi da colture pure o da brodo di glucosio azide che ha mostrato crescita quando inoculato con acqua contaminata da liquami. Hanno anche ideato un nuovo test per gli enterococchi, in cui l'Azide Dextrose Broth è stato utilizzato come terreno presuntivo e il Ethyl Violet Azide Broth come terreno di conferma.

EVA Broth è stato proposto, in combinazione con l'Azide Dextrose Broth, per il conteggio degli enterococchi mediante la tecnica MPN<sup>3-6</sup>. Una procedura simile è inclusa nelle linee guida APAT, IRSA-CNR per la rilevazione di streptococchi/enterococchi fecali nell'acqua mediante il metodo MPN.<sup>6</sup>

Il triptosio fornisce azoto, amminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica; il sodio azide limita la crescita dei batteri Gram-negativi bloccando l'enzima citocromo ossidasi e il violetto di etile inibisce sia i bacilli Gram-positivi che i cocchi Gram-positivi, ad eccezione degli enterococchi. Il glucosio è un carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia; i fosfati sono usati come agenti tampone per controllare il pH nel terreno e il cloruro di sodio contribuisce a mantenere l'equilibrio osmotico.

#### 4 – PREPARAZIONE

Sospendere 35,8 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare leggermente per sciogliere, distribuire in provette sterili (10 mL/provetta) e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

#### 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, grigia
Aspetto del terreno in provetta	ambrato, limpido
pH (20-25°C)	7,0 ± 0,2

#### 6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Ethyl Violet Azide (EVA) Broth - Litsky	Terreno di coltura in polvere	4014852	500 g (14 L)
Ethyl Violet Azide Broth	Provette pronte all'uso	551485	20 x 10 mL

#### 7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, flaconi sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

#### 8 – CAMPIONI

Acqua, alimenti, latte, mangimi per animali, campioni ambientali nel settore della produzione e manipolazione degli alimenti e altri campioni. Fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni e operare secondo le buone pratiche di laboratorio.

#### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Per l'analisi è necessario determinare il volume in funzione del tipo e della qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o acque di bassa qualità è generalmente necessario analizzare diluizioni decimali del campione, mentre per acque trattate si possono analizzare diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

1. Inoculare una serie di provette di Azide Dextrose Broth (REF 401105-551105) con adeguate diluizioni di un campione da 100 mL.

Utilizzare volumi di campione di 10 mL o meno. La capacità selettiva del brodo sarà proporzionale alla dimensione del campione.

2. Incubare a 35-37°C per 24 ± 2 ore e osservare la crescita microbica (torbidità del brodo); se non si osserva torbidità, continuare l'incubazione per altre 24 ore.

3. Prelevare 1 mL di brodo di coltura dalle provette positive e inoculare nelle corrispondenti provette contenenti Ethyl Violet Azide Broth per il test di conferma. Incubare le provette a 35-37 °C per 24+24 (±3) ore.



### 10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Considerare positive per enterococchi le provette con torbidità accompagnate da un deposito grigio-violetto sul fondo della provetta. Dopo i test di conferma, applicare le tabelle MPN per stimare il numero di enterococchi per unità volumetrica di campione.

### 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 ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°C /48H-A	buona crescita con deposito grigio-violetto sul fondo della provetta
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	37°C /48H-A	buona crescita con deposito grigio-violetto sul fondo della provetta
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C /48H-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, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Ethyl Violet Azide Broth (TB) disidratati e pronti per l'uso vengono valutati per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione ad estinzione, inoculando 1 mL di opportune diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 37°C per 48 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento ( $Gr_{RB}$ ) e nel lotto da testare ( $Gr_{TB}$ ). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 19434, *E. hirae* ATCC 10541. L'indice di produttività  $Gr_{RB}-Gr_{TB}$  per ogni ceppo testato è  $\leq 1$  e le provette mostrano crescita con un deposito grigio-viola sul fondo del tubo.

La selettività è testata con i seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 11778. Dopo incubazione a 37°C per 48 ore, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

### 13 – LIMITI DEL METODO

- Il metodo MPN con Azide Dextrose Broth/Ethyl Violet Azide Broth non è applicabile all'acqua salata come specificato dall'APHA, per la quale è consigliata la tecnica della filtrazione su membrana.
- Poiché alcuni bacilli e cocci Gram-positivi diversi dagli streptococchi fecali crescono in Azide Dextrose Broth, è necessario un test di conferma in Ethyl Violet Azide Broth o altro terreno idoneo.

### 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura e le provette pronte all'uso 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
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Dehydrated Ethyl Violet Azide (EVA) Broth è classificato come pericoloso a causa del contenuto di Sodio Azide. 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](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 buone pratiche di fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- 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.
- Ogni provetta di questo terreno di coltura è monouso.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura, 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](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 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 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).

#### Terreno disidratato

Conservare a +10°C /+30°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, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (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 definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/fiaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). Secondo MacFaddin, il brodo Ethyl Violet Azide preparato in laboratorio può essere conservato in frigorifero fino a 6-8 settimane in provette con tappo a vite.<sup>3</sup>

**16 - BIBLIOGRAFIA**

1. Litsky W, Mallmann WL, Fifield CW. A new medium for the detection of enterococci in water. Am. J Pub Health 1953; 43:873
2. Litsky W, Mallmann WL, Fifield CW. Comparison of the most probable number of Escherichia coli and enterococci in rivers waters. Am J Public Health 1955;45.1049.
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985
4. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 14th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1975
5. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, D.C. 1976
6. WHO Examination of water for pollution control. Part III: Biological, Bacteriological and Virological Examination., ed. Oxford. Pergamon Press, World Health Organization.1982
7. APAT, IRSA-CNR Manuali e Linee Guida 29/2003 Metodi analitici per le acque. Cap 3, 7040

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

 <b>REF</b> Numero di catalogo	 <b>REF</b>	 <b>LOT</b> Numero di lotto	 Monouso	 Fabbrikante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 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 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

