



m-LES ENDO AGAR

Terreno di coltura in polvere e piastre pronte all'uso



m-LES Endo Agar: colonie di *E.coli*

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio dei coliformi in campioni d'acqua mediante filtrazione su membrana.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

| | |
|-----------------------------|---------|
| Estratto di lievito | 1,20 g |
| Triptone | 3,70 g |
| Peptone | 3,70 g |
| Triptosio | 7,50 g |
| Lattosio | 9,40 g |
| Potassio fosfato bibasico | 3,30 g |
| Potassio fosfato monobasico | 1,00 g |
| Sodio cloruro | 3,70 g |
| Sodio desossicolato | 0,10 g |
| Sodio laurilsolfato | 0,05 g |
| Sodio solfito | 1,60 g |
| Fucsina basica | 0,80 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

L'Endo Agar è stato originariamente sviluppato da Endo¹ per l'isolamento del bacillo del tifo. McCarthy, Delaney e Grasso² hanno modificato la formulazione di Endo e hanno proposto il LES (Lawrence Experimental Station) Endo Agar, per il recupero dei coliformi con filtrazione su membrana, con una tecnica composta da due fasi: 1- pre-arricchimento della membrana in Lauryl Sulphate Broth, 2- incubazione della membrana su una piastra LES Endo Agar. McCarthy *et al.* hanno recuperato un numero maggiore di coliformi con il metodo a due fasi rispetto alla tecnica a una fase con terreno m-Endo.²

Entrambe le procedure di filtrazione su membrana, a uno e a due passaggi, sono state incluse nei metodi standard APHA per la rilevazione dei coliformi nelle acque potabili, non potabili e di altro tipo.³

In m-LES Endo Agar, i fattori di crescita essenziali sono forniti dai peptoni, fonti di azoto, carbonio e minerali. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. I fosfati sono utilizzati come agenti tampone per controllare il pH del terreno di coltura. 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 di sodio solfito/fucsina acida nella formulazione Endo classica è stata migliorata nella formulazione "LES" con l'inclusione di sodio desossicolato e sodio laurilsolfato. Il solfito di sodio nel terreno di coltura ha anche la funzione di decolorare la fucsina acida, come avviene nel reattivo di Schiff. I batteri che fermentano il lattosio producono acetaldeide dal lattosio che libera la fucsina dal composto incolore fucsina-solfato e colora le colonie di rosso; quando la reazione è rapida e molto intensa (ad esempio nel caso di *E. coli*), la fucsina cristallizza e produce una lucentezza metallica sulle colonie. Nelle aree della piastra con crescita intensa, la lucentezza metallica è soppressa. Gli organismi non fermentanti il lattosio producono colonie incolore sullo sfondo rosa del terreno.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 51 g in 980 mL di acqua purificata fredda e aggiungere 20 mL di etanolo al 95%. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per dissolverlo completamente. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene per risospendere il precipitato e distribuirlo in piastre Petri sterili. Non sterilizzare in autoclave, evitare la luce solare diretta.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

| | |
|-------------------------|--|
| Aspetto della polvere | Fine granulometria omogenea, porpora, con piccole particelle scure |
| Aspetto della soluzione | rosso-rosa, da leggermente opalescente a opalescente con precipitato |
| Aspetto delle piastre | rosso-rosa, leggermente opalescente |
| pH finale (20-25 °C) | 7,1 ± 0,2 |

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|-----------------|------------------------|---------|------------------------|
| m-LES Endo Agar | Terreno disidratato | 4015932 | 500 g (9,8 L) |
| LES Endo Agar | Piastre pronte all'uso | 491593 | 3 x 10 plates ø 55 mm |
| LES Endo Agar | Piastre pronte all'uso | 541593 | 2 x 10 piastre ø 90 mm |

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Campioni di acque. Consultare i testi appropriati per la raccolta, la conservazione e la preparazione dei campioni.^{3,4}

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Tecnica a un passaggio.³

1. Filtrare il campione d'acqua con un'unità di filtrazione sterile.

2. Collocare asepticamente il filtro a membrana sulla piastra m-LES Endo Agar, capovolgere la piastra e incubare per 22-24 ore a 35°C.

Tecnica a due passaggi.³





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.
2. Filtrare il campione d'acqua con un'apposita unità di filtrazione sterile.
3. Posizionare asetticamente il filtro a membrana sul tampone e incubare per 1,5 - 2 ore a 35°C in atmosfera umida.
4. Trasferire la membrana dal tampone a una piastra Petri da 55 mm contenente m-LES Endo Agar, evitando la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie dell'agar.
5. Incubare a 35°C per 20-24 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le colonie tipiche di coliformi sono di colore rosa-rosso con lucentezza metallica. La lucentezza può coprire l'intera colonia o apparire solo al centro o alla periferia.

Alcune colonie appaiono rosa o rosse ma non presentano la caratteristica lucentezza metallica. Queste colonie sono classificate come coliformi atipici e devono essere verificate con ulteriori test.

Le colonie tipiche dei fermenti non lattici sono incolori sullo sfondo rosa-rosso del terreno di coltura.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore finale 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 rosso-rosa 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-LES Endo Agar disidratato e pronto all'uso (Lotto di prova TB) viene testato per la produttività, la specificità e la selettività, confrontando i risultati con un Lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività viene testata con un metodo quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 e *E. aerogenes* ATCC 13048: il filtro a membrana sulla piastra viene inoculato con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubata a 37°C per 20-24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Se $Pr \geq 0,7$ e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie rosa-rosso con lucentezza metallica), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Inoltre, le caratteristiche di produttività e specificità sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 8739, *K. pneumoniae* ATCC 23357 e *S. Enteritidis* ATCC 13076. Dopo l'incubazione, vengono valutate la quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie: i ceppi di coliformi mostrano una buona crescita con colonie rosa-rosso con lucentezza metallica, mentre *S. Enteritidis* cresce con colonie incolori.

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

13 – LIMITI DEL METODO

- Occasionalmente, organismi non coliformi possono produrre colonie dalla tipica lucentezza.
- Occasionalmente, alcune colonie appaiono rosa o rosse, ma non presentano la 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 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.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati 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 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.

15 - 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). Secondo l'APHA, le piastre autonomamente preparate possono essere conservate a +2/+8°C al buio, preferibilmente in un sacchetto di plastica sigillato, per un massimo di 2 settimane.³ Scartare il terreno di coltura prima di 2 settimane se vi è evidenza di perdita di umidità, contaminazione del terreno di coltura, imbrunimento del terreno di coltura o formazione di una patina superficiale.³

Piastre pronte all'uso

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. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

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, 23th ed., 2017. American Public Health Association, Washington, D.C.

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 | 02/2023 |

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

