

## PEPTONE - TRYPTONE WATER

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

### 1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido per il test di produzione di indolo.

### 2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA\*

Triptone	10 g
Sodio cloruro	5 g

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

### 3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Peptone (Tryptone) Water è preparato secondo la formula descritta dalla norma ISO 7251<sup>1</sup> ed è raccomandato per la rilevazione di *Escherichia coli* in campioni di cibo e acqua sulla base della produzione di indolo.

I batteri che possiedono l'enzima triptofanasi sono in grado di idrolizzare e deaminare il triptofano con la produzione di indolo, acido piruvico e ammoniaca.<sup>2</sup> Il test dell'indolo si basa sulla formazione di un complesso di colore rosso quando l'indolo reagisce con il gruppo aldeidico della p-dimetilaminobenzaldeide del reagente di Kovacs, in condizioni acide.

Il test dell'indolo è utilizzato come parte delle procedure IMViC, una batteria di test progettati per distinguere i membri della famiglia delle Enterobacteriaceae.<sup>2</sup> La produzione di indolo è una caratteristica importante nell'identificazione di molti microrganismi, essendo particolarmente utile per individuare *E. coli* (positivo) dai membri del gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* (per lo più negativi).

Il requisito principale per la coltura di un organismo prima di eseguire il test dell'indolo è che il terreno di coltura contenga una quantità sufficiente di triptofano.<sup>3</sup>

Il terreno è ricco di triptofano, carboidrato libero e fonte di azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica. Il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico.

### 4-PREPARAZIONE

Sospendere 15 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente, se necessario, per sciogliere completamente la polvere. Dispensare il terreno in quantità da 5 mL a 10 mL in provette e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

### 5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere  
Aspetto del terreno pronto  
pH (20-25°C)

Fine granulometria omogenea, beige  
paglierino, limpido.  
7,3 ± 0,2

### 6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Peptone (Tryptone) Water	Terreno di coltura in polvere	4018912	500 g (33,3 L)
		4018914	5 kg (333 L)
Peptone (Tryptone) Water	Terreno pronto all'uso in provetta	551891	20 x 9 mL

### 7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette con tappo a vite, anse sterili, Reagente di Kovacs (REF 19171000), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

### 8-CAMPIONI

I campioni sono costituiti da colture in brodi selettivi o da colonie cresciute su terreni di coltura.

### 9-PROCEDURA DELL'ANALISI

**Test per la rilevazione e il conteggio presuntivo di *E. coli*.**<sup>1</sup>

- Inoculare provette di Lauryl Pepto Bios Broth (REF 401580) a singola e doppia concentrazione.
- Per il conteggio, seguire lo schema MPN con 3 provette a singola e 3 a doppia concentrazione inoculate con la sospensione del campione e le sue diluizioni decimali. Per il metodo di rilevazione inoculare una provetta con il terreno a singola concentrazione o una provetta con il terreno a doppia concentrazione con la sospensione iniziale, a seconda del limite richiesto.
- Incubare a 37 °C ± 1 per 24 h ± 2 h. Se in questa fase non si osserva né la produzione di gas né l'opacità, incubare fino a 48 h ± 2 h.
- Da ciascuna delle provette incubate di Lauryl Pepto Bios Broth a singola e doppia concentrazione che mostrano opacità, torbidità o gas visibili, inoculare con un'ansa da campionamento una provetta di EC Broth (REF 401425).
- Incubare le provette di EC Broth a 44 °C ± 1 °C per 24 ore ± 2 ore. Se in questa fase non vi sono gas visibili nell'EC Broth, prolungare l'incubazione fino a un totale di 48 ore ± 2 ore.
- Per il test di conferma di *E. coli* procedere come segue:
- Dopo l'incubazione, se si osserva la presenza di gas visibile, inoculare una provetta di Peptone (Tryptone) Water, preriscaldata a 44 °C, utilizzando un'ansa da campionamento.
- Incubare per 48 ore ± 2 ore a 44 °C.
- Aggiungere 0,5 mL di Reagente di Kovacs (REF 19171000) alle provette di Peptone (Tryptone) Water incubate.
- Mescolare bene ed esaminare dopo 1 minuto. Un colore rosso nella fase alcolica indica la presenza di indolo.
- Considerare positiva per *E. coli* ogni provetta di Lauryl Pepto Bios Broth a doppia concentrazione o a singola concentrazione che abbia dato luogo a un gas visibile nella provetta di EC Broth e alla produzione di indolo nella provetta di Peptone (Tryptone) Water.

### Test dell'indolo con colture pure

- Inoculare le provette di Peptone (Tryptone) Water con un leggero inoculo di una coltura pura di 18-24 ore e incubare a 44°C o 37°C per 24 ore.





2. Aggiungere 0,5 mL di Reagente di Kovacs e agitare delicatamente.

### 10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultato positivo all'indolo: formazione di un colore da rosa a rosso entro 1 minuto (che si verifica normalmente entro pochi secondi)  
Risultato negativo all'indolo: nessun cambiamento di colore, lo strato di reagente rimane giallo o leggermente torbido.

### 11-CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità che ne verifica 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 i ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

Controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922

Controllo negativo: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

### 12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Peptone (Tryptone) Water disidratato e pronto all'uso viene testato con ceppi positivi e negativi.

Ceppi positivi all'indolo (comparsa di un colore rosso-rosa sullo strato superiore del terreno di coltura entro pochi secondi): *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157 H7 ATCC 43888, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *P. vulgaris* ATCC 13315, *P. rettgeri* ATCC 39944.

Ceppi indolo-negativi (nessun cambiamento di colore dello strato superiore del terreno di coltura entro 3 minuti): *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *E. aerogenes* ATCC 13048, *C. freundii* ATCC 43864.

### 13-LIMITI DEL METODO

- Il test dell'indolo è un aiuto nella differenziazione dei microrganismi. Per un'identificazione completa si consigliano altri test adeguati.
- Il cambiamento di colore del Reagente Kovacs da giallo a marrone indica una conservazione non corretta, che può causare reazioni più deboli.

### 14-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è destinato ai 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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.
- Prestare attenzione quando si aprono flaconi e provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Provette pronte per l'uso di Peptone (Tryptone) Water sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni provetta e flacone di questo terreno di coltura è monouso.
- 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.
- 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 come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza dei prodotti 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

#### 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 produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

Secondo MacFaddin, il terreno di coltura in provetta preparato dall'utente può essere conservato a 2-8°C per 6 mesi.<sup>3</sup>

#### Terreno pronto all'uso in provetta

Conservare le provette e i flaconi nella loro confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. Se correttamente conservati, le provette e i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Non utilizzare le provette e i flaconi oltre questa data. Le provette e i flaconi delle confezioni secondarie aperte possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Le provette e i flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare provette o flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anomala, precipitato, colore atipico).

















### 16- BIBLIOGRAFIA

1. ISO 7251. Microbiology-General Guidance for enumeration of E. coli - Most Probable Number Technique. 1993-12-15
2. Maria P. MacWilliams. Indole Test Protocol. ASM, 08 December 2009, American Society for Microbiology © 2016.
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 <b>REF</b> or <b>REF</b> Numero di catalogo	 <b>LOT</b> Numero di lotto	 <b>Fabbricante</b>	 <b>Utilizzare entro</b>	 <b>Proteggere dall'umidità</b>	 <b>Fragile, maneggiare con cura</b>
 <b>Limiti di temperatura</b>	 <b>Contenuto sufficiente per &lt;n&gt; saggi</b>	 <b>Consultare le Istruzioni per l'Uso</b>	 <b>Lato superiore</b>	 <b>Proteggere dalla luce</b>	 <b>Monouso</b>

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

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

