

## PLATE COUNT AGAR WITH SKIM MILK

Terreno di coltura in polvere

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno per la conta batterica nel latte e nei prodotti lattiero-caseari.

### 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \*

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

Triptone	5,0 g
Estratto di lievito	2,5 g
Glucosio	1,0 g
Latte scremato in polvere*	1,0 g
Agar	15,0 g

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il Plate Count Agar con Skim Milk è raccomandato dalle norme ISO<sup>1-3</sup> per il conteggio dei microrganismi mesofili o psicotrofi nel latte e nei prodotti caseari.

Questo test si basa sul presupposto che ogni cellula vitale, coppia di cellule o piccolo gruppo di cellule formerà una colonia visibile, chiamata unità formante colonie (UFC), quando viene mescolata con il terreno di coltura<sup>4</sup>.

Il conteggio dei microrganismi richiede la diluizione dei campioni per ottenere una popolazione che possa essere contata con il metodo scelto.

Sono state descritte e sono disponibili diverse tecniche per la conta aerobica in piastra: tecnica della semina in piastra per inclusione, metodo della semina in piastra per diffusione superficiale, filtrazione su membrana, metodo della piastra a spirale, metodo dell'ansa calibrata, metodo della semina a goccia su piastra.<sup>4</sup> La scelta del metodo più appropriato deve tenere conto delle indicazioni delle autorità normative, del tipo di campione da analizzare, dei microrganismi attesi e del livello di contaminazione.

La norma internazionale ISO 4833-1 indica il metodo di semina in piastra per inclusione per il conteggio degli organismi mesofili ed è applicabile ai prodotti che richiedono un conteggio affidabile quando è descritto un basso limite di rilevabilità o per prodotti che si prevede contengano colonie diffuse.<sup>1</sup>

La norma ISO 4833-2 specifica una tecnica di semina diretta in superficie applicabile a prodotti contenenti organismi sensibili al calore o batteri aerobi obbligati.<sup>2</sup>

La norma ISO 17410 descrive un metodo di semina diretta in superficie per il conteggio di microrganismi psicotrofi con incubazione a 6,5°C.<sup>3</sup>

La formulazione di Plate Count Agar con Skim Milk è conforme agli standard ISO.<sup>1-3</sup> Il triptone fornisce azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, soprattutto del gruppo B. Il glucosio è una fonte di carbonio e di energia. Il latte scremato incluso nella formulazione è testato privo di antibiotici.

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

Sospendere 24,5 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente fino alla completa dissoluzione e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	beige chiaro, limpido o leggermente opalescente
pH finale (20-25 °C)	7,0 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Plate Count Agar with Skim Milk	Terreno di coltura in polvere	4019182	500 g (20,4 L)

### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio come richiesto, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

### 8 – CAMPIONI

Latte e prodotti lattiero-caseari. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.<sup>1-3</sup>

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

#### Conteggio delle colonie mediante la tecnica della semina in piastra per inclusione.<sup>1</sup>

- Utilizzando una pipetta sterile, dispensare 1 mL del campione liquido di prova, o 1 mL di una sospensione iniziale nel caso di altri prodotti, in una piastra Petri vuota e mescolare con il terreno fuso pre-raffreddato a 44-46°C.
- Preparare le altre piastre nelle medesime condizioni utilizzando diluizioni decimali del campione in esame o della sospensione iniziale.
- Incubare le piastre in condizioni aerobiche a 30 °C per 72 ore.

#### Conteggio delle colonie mediante la tecnica della semina in piastra in superficie.<sup>2,3</sup>

- Asciugare le piastre preparate prima dell'uso.
- Con una pipetta sterile, trasferire 0,1 mL del campione in esame, se il prodotto è liquido, o della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti, al centro di una piastra di Plate Count Agar with Skim Milk.
- Con lo spargitore automatico, spargere con cura l'inoculo in modo uniforme e il più rapidamente possibile sulla superficie della piastra di agar, senza toccare le pareti della piastra.
- Lasciare le piastre con i coperchi per circa 15 minuti a temperatura ambiente affinché l'inoculo venga assorbito dall'agar.
- Incubare le piastre in condizioni aerobiche a 30 °C per 72 ore per il conteggio degli organismi mesofili o a 6,5 °C per 10 giorni per il conteggio dei microrganismi psicotrofi.

Consultare lo standard internazionale appropriato per i dettagli delle procedure.<sup>1-3</sup>





### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, contare tutte le colonie nelle piastre contenenti meno di 300 colonie e calcolare il numero di microrganismi per grammo o per millilitro del campione in esame.

Seguire le procedure raccomandate per il conteggio delle colonie e la refertazione dei risultati.<sup>1-3</sup>

### 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, è facoltà l'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 8739	30°C/72H-A	buona crescita
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	30°C/72H-A	buona crescita
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	30°C/72H-A	buona crescita

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

### 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Plate Count Agar con Skim Milk (lotto di prova: TB) viene sottoposto a un test di produttività confrontando i risultati con Tryptic Soy Agar (TSA).

La produttività viene testata con un metodo quantitativo su piastra con i seguenti ceppi *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* ATCC 6633 e *L. casei* ATCC 7469. Le piastre vengono inoculate con la tecnica della semina per inclusione con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 72 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr:  $UFC_{TB}/UFC_{TSA}$ ). Se Pr è  $\geq 0,7$  i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

### 13 – LIMITI DEL METODO

- Un ritardo di oltre 10 minuti tra la dispensazione del campione nelle piastre Petri e l'aggiunta dell'agar può determinare conteggi sottostimati.<sup>4,5</sup>
- Una potenziale fonte di errore nel conteggio delle piastre può derivare dall'impilamento delle piastre di Petri: in una pila di 3 piastre, la piastra centrale e quella superiore impiegano più tempo per raffreddarsi, determinando così conteggi sottostimati.<sup>4,6</sup>
- Aumentando il tempo di permanenza delle diluizioni nel diluente si ottengono conteggi sovrastimati.<sup>4,7</sup>
- La conta delle piastre aerobiche non distingue tra diversi tipi di batteri. L'alterazione del tempo di incubazione, della temperatura e del tipo di atmosfera cambierà i tipi di organismi che cresceranno e che saranno quindi contati.<sup>4</sup>

### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato 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. 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 di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area 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

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 le norme ISO, i flaconi preparati autonomamente possono essere conservati a +2 °C - +8 °C per un massimo di 3 mesi, mentre le piastre possono essere conservate a +2 °C - +8 °C per un massimo di 4 settimane.<sup>1,3</sup>














### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique.
2. ISO 4833-2:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique.
3. ISO 17410:2019. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms
4. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed. 2015. APHA, Washington, DC.
5. Berry JM, McNeill DA, Witter LD. Effect of delay in pour plating on bacterial counts. J Dairy Sci 1969; 52:1456-1457
6. Koburger JA. Stack pouring of Petri plates: a potential source of error. J Food Prot. 1980; 43:561-562.
7. Huhtanen CN Brazis AR, Arledge WL et al. Effects of time of holding dilutions on counts of bacteria from raw milk. J Milk Food Technol. 1972; 35:126-130.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT 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 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

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

