

**ChromArt**

# CHROMOGENIC CRONOBACTER ISOLATION (CCI) AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in piastre


 CCI Agar: colonie blu-verdi: *Cronobacter sakazakii*; colonie bianche con centro nero grigio: *Salmonella Enteritidis*

## 1 – DESTINAZIONE D'USO

 Per il rilevamento (presenza/assenza) di *Cronobacter* spp. in campioni della catena alimentare, secondo ISO 22964.

## 2 – COMPOSIZIONE

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

Triptone	7,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-glucopiranoside	0,15 g
Sodium desossicolato	0,25 g
Ferro III ammonio citrato	1,00 g
Sodio tiosolfato	1,00 g
Agar	14,50 g

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

## 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 La specie *Cronobacter* (precedentemente note come *Enterobacter sakazakii*) è costituita da batteri patogeni Gram-negativi a forma di bastoncino, mobili, della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Questi microrganismi sono considerati patogeni opportunisti legati a infezioni pericolose per la vita soprattutto nei neonati.<sup>1</sup> Le sindromi cliniche dell'infezione da *Cronobacter* includono l'enterocolite necrotizzante (NEC), la batteriemia e la meningite, con tassi di letalità compresi tra il 40 e l'80%.<sup>1,2</sup> Il batterio è stato isolato da una serie di fonti alimentari tra cui alimenti a base di latticini, carni essiccate, acqua, riso e altri.<sup>1,3,4</sup>

 Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar è un terreno di coltura per la determinazione della presenza o dell'assenza di *Cronobacter* spp. nei campioni della filiera alimentare, secondo ISO 22964.<sup>5</sup> Deve essere utilizzato in combinazione con Cronobacter Screening Broth.

 Il triptone fornisce azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. L'agente selettivo del terreno è il desossicolato di sodio che inibisce la crescita dei batteri Gram-positivi. La presenza del sistema indicatore tiosolfato di sodio/ferro citrato di ammonio consente la differenziazione dei batteri positivi alla tiosolfato reductasi (ad es. *Proteus*, *Salmonella*) che producono colonie con un centro leggermente nero. Il terreno contiene il composto cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-glucopiranoside, un substrato per il rilevamento dell' $\alpha$ -glucosidasi: *Cronobacter* spp. possiedono  $\alpha$ -glucosidasi, scindono il substrato cromogenico quindi crescono con colonie da blu a blu-verdi

## 4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 31,9 g in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50 °C mescolare bene e versare in piastre Petri sterili

## 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, colore paglierino
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	ambra scuro, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,3 $\pm$ 0,2

## 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar	Terreno in polvere	4080302	500 g (15.6 L)
		4080301	100 g (3.1 L)
Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar	Piastre pronte all'uso	548030	2 x 10 plates $\varnothing$ 90 mm

## 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

## 8 – CAMPIONI

 Prodotti alimentari e ingredienti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali; campioni ambientali nel settore della produzione alimentare e della manipolazione degli alimenti. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.<sup>5</sup>

## 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Preparare il campione di prova in conformità con la parte pertinente della norma ISO 6887 relativa al prodotto in questione.

 Aggiungere 10 g o 10 mL di campione a 90 mL di Buffered Peptone Water (REF 401278). Per inoculo superiore a 10 g preriscaldare il brodo a 34-38°C. Incubare il brodo di pre-aricchimento a 36  $\pm$  2 °C per 18  $\pm$  2 ore.

Trasferire 0,1 mL di brodo pre-aricchito in 10 mL di Cronobacter Screening Broth (REF 401355)

 Incubare le provette del brodo di arricchimento a 41,5  $\pm$  1 °C per 24  $\pm$  2 ore




Strisciare un'ansa di brodo di arricchimento (circa 10 µL) su una piastra di CCI Agar e incubare capovolta a 41,5 ± 1 °C per 24 ± 2 ore.

#### 10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le tipiche colonie di *Cronobacter* sono di dimensioni da piccole a medie (da 1 mm a 3 mm) e di colore da blu a blu-verde.

Su CCI Agar possono svilupparsi colonie di batteri Gram-negativi atipici con le seguenti caratteristiche: bianche, con o senza centro grigio, nero o verde; alcune colonie naturalmente pigmentate di non-*Cronobacter* possono apparire gialle o rosse.

Eseguire i test di conferma sulle colonie tipiche come riportato da ISO 22964.<sup>5</sup>

#### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore 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 alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	41.5 °C ± 1°C /24 h ± 2 h / A	Buona crescita, colonie blu-verdi
<i>C. muytjensis</i> ATCC 51329	41.5 °C ± 1°C /24 h ± 2 h / A	Buona crescita, colonie blu-verdi
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	41.5 °C ± 1°C /24 h ± 2 h / A	Colonie bianche
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	41.5 °C ± 1°C /24 h ± 2 h / A	Inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

#### 12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima della messa in vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar disidratato e pronto all'uso vengono testati per produttività, specificità e selettività con incubazione a 41,5°C per 24 ore, confrontando i risultati con un precedente lotto di riferimento approvato.

La produttività è testata con una tecnica ecometrica semi-quantitativa con i ceppi target *C. sakazakii* ATCC 29544, *C. sakazakii* wild strain CB CRO.10.4 e *C. muytjensis* ATCC 51329. La quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie vengono valutate dopo l'incubazione: i ceppi target crescono con colonie blu-verdi. Le caratteristiche di specificità sono testate con tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi: *E. cloacae* ATCC 13047 e *S. Typhimurium* ATCC 14028. Vengono valutate la quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie: *E. cloacae* cresce con colonie bianche, mentre *S. Typhimurium* cresce con colonie dal centro grigio.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato di semina in superficie inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi non target *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433 e *B. cereus* ATCC 14579. Dopo l'incubazione, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

#### 13 – LIMITI DEL METODO

- *Cronobacter* può essere presente in quantità ridotte nei campioni, insieme ad altre *Enterobacteriaceae*, come *E. cloacae*, che possono interferire nella determinazione del microrganismo bersaglio.<sup>5</sup>
- L'utilizzo di campioni di grandi dimensioni può compromettere il recupero di *Cronobacter* spp. quando sono presenti microflora interferenti, come i probiotici.<sup>5</sup>

#### 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 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 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](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

##### 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 scopolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).





### Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +2°C /+8°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 la norma ISO 22964<sup>5</sup>, il terreno su piastra può essere conservato a 5°C ± 3 °C per un massimo di 14 giorni.

### 16 - Bibliografia

1. Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. Cronobacter species (formerly known as Enterobacter sakazakii) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium, J App Microbiol 2012; 113:1-15
2. Friedemann, M. Epidemiology of invasive neonatal Cronobacter (Enterobacter sakazakii) infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28:1297-1304.
3. Bowen AB, Braden CR. Invasive Enterobacter sakazakii disease in infants. Emerg Infect Dis 2006; 12:1185-1189.
4. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, Callanan JJ, Fanning, S (2010) Cronobacter (Enterobacter sakazakii): an opportunistic foodborne pathogen. Foodborne Pathog Dis 2010; 7:339-350.
5. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of Cronobacter spp.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

<b>REF</b> o REF Numero di catalogo	<b>LOT</b> Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	 Monouso
 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	05/2023

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

