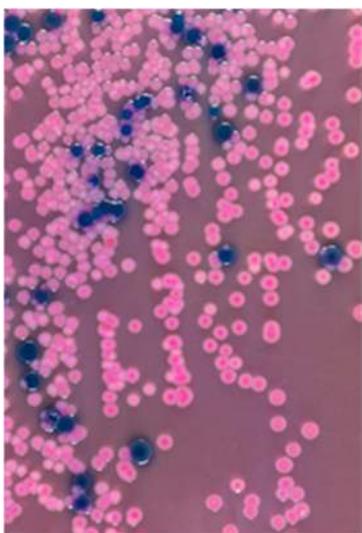


ChromArt

CHROMOGENIC YERSINIA AGAR BASE CHROMOGENIC YERSINIA SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo



Chromogenic Yersinia Agar:
Yersinia enterocolitica: colonie a "occhio di bue";
Serratia marcescens: colonie blu.

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per la determinazione della presenza/assenza di *Yersinia enterocolitica* nei campioni della filiera alimentare.

2 - COMPOSIZIONE*

CHROMOGENIC YERSINIA AGAR BASE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA

Peptoni	22,0 g
Cellobiosio	20,0 g
Sodio piruvato	2,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio desossicolato	0,5 g
Rosso neutro	0,03 g
Violetto cristallo	0,001 g
Irgasan	0,004 g
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucopyranoside (X-Glupy)	0,2 g
Fattori di crescita	0,15 g
Agar	12,0 g

CONTENUTO DEI FLACONI DEL SUPPLEMENTO

CHROMOGENIC YERSINIA SUPPLEMENT PER 500 ML DI TERRENO

Miscela di antimicrobici	0,0875 g
--------------------------	----------

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Chromogenic Yersinia Agar è una modifica di Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar originariamente sviluppato nel 1979 da Schiemann,¹ ideato per differenziare, con una reazione cromogenica, le colonie di alcuni enterobatteri da quelle di *Yersinia enterocolitica*, aumentando così la specificità del metodo.

Chromogenic Yersinia Agar, completo della miscela antibiotica del supplemento selettivo, può essere utilizzato come secondo terreno su piastra nella procedura raccomandata dalla norma ISO 10273² per la determinazione della presenza o dell'assenza di *Y. enterocolitica* patogena nei campioni della catena alimentare.

Peptone e fattori speciali di crescita forniscono nutrienti per la crescita batterica. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico del terreno. Il piruvato di sodio aiuta la rivitalizzazione delle cellule sub-letalmente danneggiate. I batteri Gram-positivi e alcuni Gram-negativi (es. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*) sono inibiti dagli agenti selettivi presenti nella base del terreno (sodio desossicolato, cristalvioletto, irgasan) e nell' integratore liofilizzato. Il cellobiosio è presente come carboidrato fermentabile: i batteri che fermentano il cellobiosio inducono l'acidificazione del terreno con precipitazione del desossicolato e assorbimento del rosso neutro; *Y. enterocolitica* quindi coltiva con l'aspetto caratteristico delle colonie "a occhio di bue": il centro della colonia rosso intenso con margine trasparente. I microrganismi che non metabolizzano il cellobiosio in prodotti finali acidi formano colonie incolori. Il terreno contiene anche X-Glupy: le colonie di ceppi β-glucosidasi positivi idrolizzano il composto cromogenico con formazione di un cromoforo verde-blu. *C. freundii*, *P. rettgeri*, *S. marcescens*, *K. oxytoca* formano colonie blu o blu-verdi.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 30,9 g in 500 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 e aggiungere il contenuto di una fiala di Chromogenic Yersinia Supplement (REF 4240095) disciolto con 5 mL di acqua purificata sterile, utilizzando precauzioni asettiche. Mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, grigia
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	rosso-viola, leggermente opalescente
Aspetto del supplemento liofilizzato	pastiglia bianca, bassa e compatta
Aspetto della soluzione	incolore, limpido
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Yersinia Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4080502	500 g (8,09 L)
Chromogenic Yersinia Supplement	Supplemento liofilizzato	4240095	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, 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.²

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare la sospensione del campione con Yersinia PSB Broth (REF 402270) per ottenere una diluizione 1:10 (es: 25 g di campione +225 mL di terreno liquido).

Il metodo ISO 10273 prescrive l'inoculo diretto della sospensione del campione su piastre CIN Agar e su terreno cromogenico o l'inoculo del campione dopo arricchimento.

SEMINA DIRETTA

Utilizzando la sospensione PSB iniziale, dividere un volume di 1 mL su due o quattro piastre di CIN agar e un volume di 1 mL su due o quattro piastre di Chromogenic Yersinia Agar. Stenderlo sulla superficie con una spatola. Capovolgere le piastre e metterle nell'incubatrice a 30°C per 24 h ± 2 h.

SEMINA DOPO ARRICCHIMENTO

Trasferire 10 mL della sospensione iniziale in PSB (REF 402270) in 90 mL di Yersinia ITC Broth (REF 402265).

Incubare la sospensione iniziale in PSB e il brodo di arricchimento selettivo ITC a 25 °C per 44 h ± 4 h.

Utilizzando una pipetta sterile, trasferire 0,5 mL dell'arricchimento PSB in 4,5 mL di soluzione KOH (0,5 g in 100 mL di soluzione fisiologica sterile) preparata il giorno prima dell'uso, e mescolare. Dopo 20 s ± 5 s dall'aggiunta dell'arricchimento PSB alla soluzione KOH, strisciare con un'ansa la superficie di una piastra di CIN Agar e di una piastra di Chromogenic Yersinia Agar.

Ripetere la procedura per l'arricchimento dell'ITC.

Capovolgere le piastre e metterle nell'incubatrice a 30°C per 24 h ± 2 h.

Inoculare le piastre CIN Agar e Chromogenic Yersinia Agar anche con colture PSB e ITC non trattate.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Dopo un'incubazione a 30°C per 24 h ± 2 h su Chromogenic Yersinia Agar, *Y. enterocolitica* cresce con colonie rosse, con bordo trasparente circostante. Il diametro delle colonie cambia da un ceppo all'altro ma è lo stesso all'interno dello stesso sierotipo.

K. oxytoca, *C. freundii*, *P. rettgeri*, *S. marcescens* possono crescere e formare colonie blu o verde/blu. *Aeromonas hydrophila* cresce con colonie rosa. I batteri Gram-positivi sono totalmente inibiti. Eseguire i test di conferma, secondo le raccomandazioni della ISO 10273², sulle colonie tipiche.

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>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	30°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie con centro rosso
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	30°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie blu
<i>E. coli</i> ATCC 25922	30°C / 18-24H / A	inibito
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	30°C / 18-24H / A	inibito

A: incubazione aerobica; 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 Chromogenic Yersinia Agar Base disidratato addizionato con Chromogenic Yersinia Supplement viene testato per produttività, specificità e selettività con incubazione a 30°C per 24 ore, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *Y. enterocolitica* ATCC 23715 e ATCC 9610: le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr). Se Pr è ≥ 0,7 e se la morfologia ed il colore delle colonie sono tipiche (colonie "a occhio di buco": centro della colonia rosso intenso con margine trasparente) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità è testata con una tecnica ecometrica semi-quantitativa con i ceppi non target *S. marcescens* ATCC 8100 e *A. hydrophila* ATCC 7965. La quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie sono valutate dopo l'incubazione: *S. marcescens* cresce con colonie blu-verdi mentre *A. hydrophila* presenta una crescita leggera con colonie incolori con centro rosa.

La selettività è valutata con metodo Miles-Misra modificato 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. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

13– LIMITI DEL METODO

- In caso di crescita abbondante della flora di fondo sulle piastre, le dimensioni delle colonie di *Y. enterocolitica* possono essere più piccole e il tipico centro rosso può essere poco chiaro o assente.
- Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* crescono allo stesso modo di *Y. enterocolitica* e mostrano la stessa morfologia delle colonie.
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, da coltura pura, per una completa identificazione.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento sono destinati esclusivamente al controllo microbiologico e all'uso professionale; devono essere utilizzati da personale di laboratorio adeguatamente addestrato e qualificato, osservando le precauzioni approvate in materia di rischio biologico e le tecniche asettiche.





- Il terreno di base e il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Chromogenic Yersinia Supplement è classificato come pericoloso. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza dei materiali.
- 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.
- Prestare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, il supplemento o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno e il supplemento non utilizzato 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 la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 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 +2°C /+8°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).

Supplemento selettivo

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. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

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 (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Schiemann D A. Synthesis of a selective agar medium for Yersinia enterocolitica. Can J Microbiol 1979; 25(11):1298-1304,
2. ISO 10273:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of pathogenic Yersinia enterocolitica

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	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del Layout	11/2024

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

