



m-AEROMONAS SELECTIVE AGAR BASE (HAVELAAR) AEROMONAS SELECTIVE SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo



Aeromonas Selective Agar (Havelaar): crescita di *A. hydrophyla* con colonie gialle su membrana filtrante

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la determinazione ed il conteggio di *Aeromonas* nelle acque con la tecnica delle membrane filtranti.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

AEROMONAS SELECTIVE AGAR BASE (HAVELAAR)

Triptosio	5,00 g
Estratto di lievito	2,00 g
Destrina	11,40 g
Sodio cloruro	3,00 g
Potassio cloruro	2,00 g
Magnesio solfato	0,10 g
Ferro cloruro	0,06 g
Sodio desossicolato	0,10 g
Blu di bromotimolo	0,08 g
Agar	13,00 g

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

AEROMONAS SELECTIVE SUPPLEMENT

CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO

Ampicillina	5 mg
-------------	------

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I batteri del genere *Aeromonas* sono bastoncini Gram-negativi, anaerobici facoltativi, che assomigliano morfologicamente ai membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il significato delle specie *Aeromonas* come agenti patogeni per l'uomo sta ricevendo crescente attenzione.¹ Sono microrganismi ubiquitari nelle acque dolci e salmastre², sono considerati potenziali agenti di tossinfezioni alimentari³ e sono responsabili ed implicati in una serie di infezioni intestinali ed extra intestinali nell'uomo e in altri animali.⁴

m-Aeromonas Selective Agar Base, addizionato con ampicillina, corrisponde al terreno descritto da Havelaar et al.^{5,6} È raccomandato dalla United States Environmental Protection Agency (USEPA), Method 1605, per la rilevazione di *Aeromonas* mediante filtrazione su membrana nell'acqua trattata.⁷

Il recupero dalle colture pure e dai campioni ambientali è ottimale e la specificità è elevata.⁵ L'impiego di ampicillina sopprime adeguatamente la flora contaminante, senza ridurre il recupero di *Aeromonas*. La frequenza dei ceppi sensibili a 10 mg/L di ampicillina è inferiore all'1%.⁵

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 18,35 g in 500 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50°C e, in condizioni asettiche, aggiungere il contenuto di una fiala di Aeromonas Selective Supplement-Ampicillina (REF 4240012) ricostituita con 5 ml di acqua distillata sterile. Mescolare bene e trasferire in piastre da 55 mm.

I metodi USEPA richiedono l'aggiunta di vancomicina cloridrato: ricostituire una fiala di Vancomicina Selective Supplement CSB (REF 4240057C) con 5 mL di acqua purificata sterile; a 500 mL di terreno preparato come descritto sopra con ampicillina, aggiungere 1 mL di Vancomycin Selective Supplement CBS (concentrazione finale di vancomicina: 2 mg/L).

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aeromonas Selective Agar Base (Havelaar)

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea grigio-verde
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	limpido di colore verde-azzurro
pH (20-25 °C)	8,0 ± 0,2

Aeromonas Selective Supplement

Aspetto del liofilizzato	pastiglia bassa, compatta, bianca
Aspetto della soluzione	limpida, incolore

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
m-Aeromonas Selective Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4010192	500 g (13,6 L)
Aeromonas Selective Supplement-Ampicillin	Supplemento liofilizzato	4240012	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagno termostato, incubatore, anse sterili e tamponi, altra attrezzatura di laboratorio, beute Erlenmeyer, capsule di Petri da 55mm, membrane filtranti sterili, terreni di coltura accessori per completare l'identificazione dei ceppi isolati.





8 – CAMPIONI

Campioni rappresentativi del Sistema di distribuzione dell'acqua potabile. Consultare idonei riferimenti bibliografici per la raccolta, la protezione e conservazione del campione.^{7,8}

9 – PROCEDURA D'ANALISI

Filtrare volumi adeguati di diluizioni decimali dei campioni, attraverso membrane filtranti (dimensione dei pori 0,45 µm) e trasferire i filtri sulla superficie del terreno. Incubare in condizioni aerobiche a 30°C⁵ o 35°C⁷ per 24 ± 2 ore.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DELL'ANALISI

Dopo l'incubazione, le colonie di *Aeromonas* mostrano un colore giallo visibile (fermentazione della destrina). Il rilevamento della fermentazione della destrina è considerato altamente specifico e finora non sono stati trovati ceppi di *Aeromonas* negativi alla destrina.⁵ Confermare la rilevazione presuntiva con test biochimici standard: fermentazione del trealosio, test dell'ossidasi e produzione di indolo. Qualsiasi colonia presuntiva che è positiva all'ossidasi, fermenta trealosio e produce indolo è da considerarsi *Aeromonas*.⁷

11 – CONTROLLO QUALITÀ

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

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	35°C / 24 H/ A	crescita con colonie gialle
<i>E. coli</i> ATCC 11775	35°C / 24 H/ A	crescita inibita

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

12 – VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti del terreno in polvere m-*Aeromonas* Selective Agar Base supplementato con ampicillina viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato.

Le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target *A. hydrophila* ATCC 7966 and *A. hydrophila* ATCC 35654. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore viene valutata e registrata la quantità di crescita in piastra e le caratteristiche delle colonie: i ceppi target evidenziano buona crescita e colonie di color giallo.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *S. marcescens* ATCC 8100, *P. aeruginosa* ATCC 14207, *E. faecalis* ATCC 19433, *S. aureus* ATCC 25923. *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis* sono totalmente inibiti, mentre la crescita degli altri ceppi non target è parzialmente inibita.

13-LIMITI DEL METODO

- Una percentuale molto bassa di *Aeromonas*, sensibile a 10 mg/L di ampicillina, può essere inibita dal terreno.
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa su isolati, da coltura pura, per una completa identificazione.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici 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 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 all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- 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 qui descritto come principio attivo 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 in polvere

Conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dall'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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento).

Supplemento selettivo










Conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo dalla luce diretta. Se correttamente conservato, il prodotto può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata in etichetta; non utilizzare oltre questa data. Una volta che il flaconcino è stato aperto e il prodotto liofilizzato è stato ricostituito, la soluzione risultante deve essere utilizzata immediatamente. Prima dell'uso, esaminare il prodotto liofilizzato e ricostituito ed eliminarlo se vi sono evidenti segni di deterioramento (ad es. contaminazione, colore atipico o altre caratteristiche anomale).

L'utilizzatore è responsabile dei processi di produzione e controllo qualità dei terreni preparati e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). Secondo il metodo USEPA⁷, le piastre preparate con vancomicina devono essere conservate in un contenitore a chiusura ermetica (ad esempio un sacchetto di plastica sigillato) a una temperatura compresa tra 1 e 5°C per non più di 14 giorni.

16 - BIBLIOGRAFIA

- Holmberg SC, Farmer JJ. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections Rev Inf Dis. 1984; 6: 633-639
- Graf J (editor). (2015). *Aeromonas*. Caister Academic Press.
- Palumbo SA, Maxino F, Williams AC Buchanan RL, Thayer DW.. Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. App Environ Microbiol. 1985; 50:1027-1030.
- Parker JL, Shaw JG. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. J Infect . 2011 Feb; 62(2):109-18.
- Havelaar AH, During M, Versteegh JFM. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. J App Bact 1988; 62: 279-287.
- Havelaar AH, Vonk M. The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. Letters App Bact 1988; 7: 169-171
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), Method 1605: *Aeromonas* in Finished Water by Membrane Filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V). October 2001.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizioni delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2022

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

