

**ChromArt**

# SENECA

**(Simultaneous Enumeration Enterobacteriaceae E.coli Agar)****Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo**

SENECA: *E. coli* colonie blu;  
*K. pneumoniae* and *S. Enteritidis* (colonie rosse)

**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Per il conteggio simultaneo di *Enterobacteriaceae* ed *E. coli* in acqua, alimenti e altri campioni di interesse sanitario.

**2 - COMPOSIZIONE\*****SENECA BASE-TERRENO DISIDRATATO****FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA**

Peptoni	15,00 g
Carboidrati	2,50 g
Agenti selettivi	0,50 g
Tampone fosfato	4,30 g
Composti cromogeni	0,12 g
Agar	15,00 g

**SENECA EE-EC SUPPLEMENT****CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO**

Agenti antimicrobici	4,5 mg
Composti cromogeni	6,25 mg

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

**3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

SENECA rappresenta uno sviluppo del terreno EE-EC Agar, che Biolife ha ideato e proposto, prima al mondo, per il conteggio simultaneo di *E. coli* ed *Enterobacteriaceae*.

Il solo conteggio di *E. coli* viene effettuato mediante determinazione dell'enzima  $\beta$ -D-glucuronidasi su Base SENECA.<sup>1-3</sup> Il conteggio simultaneo di *Enterobacteriaceae* ed *E. coli* viene effettuato mediante l'aggiunta di uno specifico supplemento (SENECA EE-EC Supplement) al terreno di base che conferisce alle colonie di *Enterobacteriaceae* una colorazione rosa-rossa.

**4 - PREPARAZIONE**

Sospendere 18,7 g di SENECA Base in 500 mL di acqua depurata fredda. Portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min. Raffreddare a 47-50°C.

Per la conta di *E. coli*: utilizzare così com'è.

Per il conteggio simultaneo di *E. coli* ed *Enterobacteriaceae*: sciogliere il contenuto di un flacone di SENECA EE-EC Supplement (REF 4240023) con 1 mL di etanolo, miscelare e quindi aggiungere 1 mL di acqua distillata sterile; aggiungere a 500 mL di SENECA Base autoclavato e raffreddato a 47-50°.

**5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in soluzione e in piastra

giallo scuro, limpido

Aspetto del supplemento liofilizzato

pastiglia rosa, soluzione giallo pallido e limpida con un leggero precipitato dopo la ricostituzione

pH del terreno completo (20-25°C)

7,3 ± 0,2

**6 - MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
SENECA Base	Terreno di coltura in polvere	405582S2	500 g (13,36 L)
SENECA EE-EC Supplement	Supplemento liofilizzato	4240023	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**

Acqua, alimenti, mangimi, campioni di filiera alimentare. 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.

**9 - PROCEDURA DELL'ANALISI****Metodo di filtrazione su membrana**

Filtrare 100 mL (o altri volumi, ad esempio 250 mL per l'acqua in bottiglia) del campione utilizzando un filtro a membrana solitamente di diametro di 47 mm o 50 mm, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro nominale dei pori di 0,45  $\mu$ m e, preferibilmente, dotato di griglia. Il volume minimo di filtrazione è di 10 mL di campione o di diluizioni dello stesso per garantire una distribuzione uniforme dei batteri sulla membrana filtrante.

Dopo la filtrazione posizionare il filtro a membrana sulla piastra, assicurandosi che non vi sia aria intrappolata al di sotto

**Metodo per inclusione**

Versare nelle piastre 1 mL della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali del campione. Aggiungere circa 15 mL di terreno pre-raffreddato. Mescolare bene l'inoculo con il terreno.



**Tecnica di semina superficiale**

1. Asciugare le piastre preparate prima dell'uso.
2. Utilizzando 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.
3. Distribuire con cura l'inoculo in modo uniforme e il più rapidamente possibile sulla superficie della piastra di agar, senza toccare i lati della piastra con lo spargitore.
4. Lasciare le piastre con i coperchi per circa 15 minuti a temperatura ambiente affinché l'inoculo venga assorbito dall'agar.

**Incubazione**

Incubare per  $24 \pm 2$  ore a  $37^\circ \pm 1$  C. In caso di crescita lieve, scarsa pigmentazione o assenza di crescita, incubare nuovamente per altre 24 ore.

**10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ogni specifico colore e caratteristica morfologica delle colonie.

**Conteggio di *E. coli* + *Enterobacteriaceae*** (SENECA Base 405582S + SENECA EE-EC Supplement 4240023).

Contare come *Enterobacteriaceae* tutte le colonie rosse e blu.

Contare come *E. coli*  $\beta$ -D glucuronidasi positive tutte le colonie blu.

**Conteggio di *E. coli*** (SENECA Base 405582S).

Contare come *E. coli*  $\beta$ -D glucuronidasi positive tutte le colonie blu.

**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.

Controllo della produttività - *E. coli* ATCC 25922: crescita, colonie blu

Controllo della specificità - *E. aerogenes* ATCC 13048: crescita, colonie rosse

Controllo della selettività - *S. aureus* ATCC 25923: inibito; *P. aeruginosa* ATCC 14207: inibito

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

**12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI**

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di SENECA Base addizionato con SENECA EE-EC Supplement (TB: Test Batch) viene valutato per produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

Produttività e specificità sono testate mediante un test quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 e *S. Typhimurium* ATCC 14028: le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a  $37^\circ\text{C}$  per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività ( $Pr: UFC_{RB}/UFC_{TB}$ ). Se  $Pr \geq 0,7$  e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipiche (colonie blu di *E. coli*, colonie rosse di *S. Typhimurium*) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. Inoltre le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semi-quantitativa con i seguenti ceppi target: *C. freundii* ATCC 8090, *P. mirabilis* ATCC 12453, *P. stuartii* ATCC 33672. La quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie sono valutate dopo incubazione a  $37^\circ\text{C}$  per 24-48 ore: tutti i ceppi del test mostrano una buona crescita con tipiche colonie rosse.

La selettività è valutata con metodo Miles-Misra modificato in superficie inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland dei ceppi non target *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. hydrophila* ATCC 7965. *E. faecalis* ATCC 19433, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633. Dopo incubazione a  $37^\circ\text{C}$  per 24 ore, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

**13– LIMITI DEL METODO**

- Circa il 3-4% di *E. coli* è  $\beta$ -glucuronidasi negativo, in particolare i ceppi di *E. coli* O157.<sup>4</sup> Di conseguenza, alcuni ceppi di *E. coli*, inclusi quelli patogeni, non saranno rilevati su SENECA Base e saranno riconosciuti come *Enterobacteriaceae* su SENECA EE-CE.
- È stato riportato che circa il 40% delle specie *Shigella*, vari bio-sierotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* sottogenere I) possono essere  $\beta$ -glucuronidasi positive; solo eccezionalmente questo test è positivo con ceppi *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).<sup>5-6</sup>
- Se si sospetta una forte contaminazione, nella tecnica per inclusione, dopo l'inoculazione dello strato basale e la sua solidificazione, aggiungere uno strato superficiale di circa 5 mL dello stesso terreno.

**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. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. L'acetato di tallio ha un'elevata tossicità. 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](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 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](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 +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. Bascomb S. Enzyme tests in bacterial identification. *Methods Microbiol* 1987; 19:105-160.
2. Manafi M, Kneifel W, Bascomb S Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Micr Rev*, Sept. 1991, p. 335-348
3. Watson RR.. Substrate specificities of aminopeptidases:a specific method for microbial differentiation, p. 1-14. In J. R.Norris (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 9. 1976, Academic Press (London), Ltd., London.
4. Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* 177: 1750–1753.
5. Kilian M. & Bulow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B.* 1976, 84: 245–251.
6. Le Minor, Buisnière J, Novel G, Novel M. Relation entre le sérotype et l'activité  $\beta$ -glucuronidasiq ue chez les *Salmonella*. *Ann Microbiol (Paris)* 1978; 129B (2) :155–165.

#### 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 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	05/2023

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

