



YERSINIA ITC BROTH BASE
POTASSIUM CHLORATE SUPPLEMENT
TICARCILLIN IRGASAN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT
YERSINIA ITC BROTH

Terreno di coltura in polvere, supplemento selettivo e flaconi pronti all'uso

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno di arricchimento liquido per la rilevazione di *Yersinia enterocolitica* in campioni della catena alimentare.

2 - COMPOSIZIONE***YERSINIA ITC BROTH BASE****FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIOLIMENTO IN ACQUA**

Triptone	10.00 g
Estratto di lievito	1.00 g
Magnesio cloruro anidro	28.10 g [^]
Sodio cloruro	5.00 g
Verde malachite	0.01 g

[^] equivalente a 60 g/L di Magnesio cloruro esaidrato

TICARCILLIN IRGASAN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT, CONTENUTO DEL FLACONE PER 250 mL DI TERRENO

Ticarcillina	0.25 mg
Irgasan	0.25 mg

POTASSIUM CHLORATE SUPPLEMENT , CONTENUTO DEL FLACONE PER 250 mL DI TERRENO

Potassio clorato soluzione 5%	5 mL
-------------------------------	------

YERSINIA ITC BROTH

Triptone	10.00 g
Estratto di lievito	1.00 g
Magnesio cloruro anidro	28.10 g [^]
Sodio cloruro	5.00 g
Verde malachite	0.01 g
Potassio clorato	1.00 g
Ticarcillina	1.00 mg
Irgasan	1.00 mg
Acqua purificata	1000 mL

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

[^] equivalente a 60 g/L di Magnesio cloruro esaidrato

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il genere *Yersinia* comprende coccobacilli Gram-negativi, di cui tre specie, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* e alcuni ceppi di *Yersinia enterocolitica* sono di importanza patogena per l'uomo. *Y. enterocolitica* è ubiquitaria, essendo frequentemente isolata dal suolo, dall'acqua, dagli animali e da una varietà di alimenti.¹ La forma più comune di malattia dovuta a *Y. enterocolitica* è la gastroenterite associata al consumo di cibo o acqua contaminati.²

Il rilevamento di *Y. enterocolitica* può comportare fino a quattro passaggi successivi: primo arricchimento, secondo arricchimento, semina su piastra, conferma/identificazione.

Il brodo Irgasan Ticarcillin Chlorate (ITC) è un terreno liquido di arricchimento selettivo derivato dalla base Rappaport modificata, sviluppato da Wauters *et al.*³ È risultato essere il metodo più efficiente per il recupero di *Y. enterocolitica* biotipo 4, sierotipo 0:3 , che è il sierotipo clinico più comune in Europa.^{3,4}

Il brodo ITC è incluso nella procedura ISO 10273⁵ per il rilevamento di *Y. enterocolitica* in campioni della catena alimentare.

Il metodo di rilevazione del patogeno *Y. enterocolitica* raccomandato dalla norma ISO 10273⁵ prevede l'omogeneizzazione del campione in brodo PSB seguita da: 1) inoculazione diretta su piastre di CIN agar, 2) incubazione in brodo PSB, 3) seconda fase di arricchimento in brodo ITC, 3) trattamento alcalino, 4) semina dei brodi di arricchimento trattati su CIN Agar.

Yersinia ITC Broth Base contiene triptone, che fornisce azoto, aminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica, estratto di lievito, fonte di vitamine, in particolare del gruppo B, cloruro di sodio che contribuisce a mantenere l'equilibrio osmotico del terreno, e i composti selettivi di base verde malachite e cloruro di magnesio. La selettività è migliorata dagli antimicobici inclusi nei supplementi selettivi: iргasan con proprietà inibitorie nei confronti dei batteri Gram-negativi, ticarcillina con attività battericida principalmente sui batteri Gram-negativi ma anche sui Gram-positivi e clorato di potassio, inibente per le *Enterobacteriaceae* che possiedono nitrasi di tipo A.⁴

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 11 g in 250 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare per sciogliere completamente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50 °C e aggiungere asetticamente il contenuto di una fiala di Potassium Chlorate Supplement (REF 4240065) e una fiala di Ticarcillin Irgasan Antimicrobial Supplement (REF 4240070) ricostituiti con 2 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e dispensare il terreno in modo asettico in quantità da 90 mL in flaconi di capacità adeguata, in modo da ottenere il minimo rapporto area/volume (anaerobiosi relativa).

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO***Yersinia ITC Broth Base***

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige-verde
Aspetto del terreno in soluzione	blu-verde, limpido





Ticarcillin Irgasan Antimicrobial Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato pastiglia bianca, bassa e friabile

Aspetto della soluzione incolore, limpido

Potassium Chlorate Supplement

Aspetto della soluzione incolore, limpido

pH finale (20-25°C) 6,9 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Yersinia ITC Broth Base	Terreno di coltura in polvere	4022652	500 g (11,3 L)
Ticarcillin Irgasan Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240060	10 flaconi, ciascuno per 250 mL di terreno
Potassium Chlorate Supplement	Supplemento liquido	4240065	10 flaconi, ciascuno per 250 mL di terreno
Yersinia ITC Broth	Flaconi pronti all'uso	5122652	6 x 90 mL

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, anse sterili, spargitori e pipette, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, flaconi, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nel settore della produzione alimentare e della manipolazione degli alimenti. Fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili⁵ per la raccolta, il trasporto, la conservazione, la preparazione dei campioni e operare secondo le buone pratiche di laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Rilevazione di *Y. enterocolitica* secondo ISO 10273³

1. Sospensione iniziale: omogeneizzare 25 g di campione in 225 mL di PSB Broth (REF 402270).
2. Trasferire 10 mL di sospensione PSB in 90 mL di brodo ITC e miscelare.
3. Utilizzando la sospensione PSB iniziale, dividere un volume totale di 1 mL su due o quattro piastre di agar CIN⁴ e distribuirlo sulle piastre.
4. Capovolgere le piastre di CIN agar e incubare a 30 °C per 24 h ± 2 h.
5. Incubare la sospensione iniziale in PSB broth e ITC broth a 25 °C per 44 h ± 4 h.
6. Eseguire il trattamento alcalino trasferendo 0,5 mL di PSB broth e ITC broth incubati in 4,5 mL di KOH allo 0,5% in soluzione fisiologica e mescolare.
7. Dopo 20 ± 5 secondi dall'aggiunta degli arricchimenti PSB/ITC alla soluzione di KOH, strisciare con un'ansa la superficie di una piastra di CIN agar e la superficie di una piastra di un agar cromogenico⁵ in modo da ottenere colonie ben separate.
8. Incubare le piastre di CIN agar a 30 °C per 24 h ± 2 h. Incubare le piastre cromogeniche secondo le istruzioni per l'uso.
9. Eseguire i test di conferma e biotipizzazione secondo le modalità descritte dalla norma ISO.

Note

⁴ CIN Agar Base (REF 401302) + supplemento selettivo Yersinia (REF 4240011)⁵ Chromogenic Yersinia Agar Base (REF 408050) + Chromogenic Yersinia Supplement (REF 4240095).

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita batterica nel brodo ITC è evidenziata dallo sviluppo di torbidità.

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 23715 +	25°C/ 44h/ A	> 10 di colonie tipiche dopo subcoltura su CIN Agar
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853+		
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906		

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, tutti i lotti di *Yersinia* ITC Broth Base disidratato addizionati con i supplementi clorato di potassio e ticarcillin- Irgasan e tutti i flaconi pronti all'uso, vengono testati per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività e la selettività sono testate insieme alle seguenti miscele di opportune diluizioni di ceppi target (≤ 100 UFC/provetta) e ceppi non target (≥ 10000 UFC/provetta): *Y. enterocolitica* ATCC 23715 + *P. aeruginosa* ATCC 27853 + *E. coli* ATCC 8739 e *Y. enterocolitica* DSM 13030 + *P. aeruginosa* ATCC 27853 + *E. coli* ATCC 8739. Dopo l'incubazione delle provette inoculate a 25°C per 44 ore e la sottocoltura su CIN Agar, i ceppi target mostreranno una crescita predominante su piastra (> 10 colonie tipiche).

Inoltre, la produttività viene valutata mediante il metodo della diluizione ad estinzione, inoculando 1 mL di opportune diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 25°C per 44 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento (Gr_{RB}) e nel lotto del test (Gr_{TB}). La produttività è testata con i seguenti ceppi bersaglio: *Y. enterocolitica* ATCC 23715 e *Y. enterocolitica* ATCC 9610. L'indice di produttività Gr_{RB}/Gr_{TB} per ciascun ceppo di prova deve essere ≤ 1 .

La selettività è testata mediante metodo della diluizione fino ad estinzione con il ceppo non target *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. mirabilis* ATCC 29906. La crescita dei ceppi non target è totalmente inibita sulla subcultura su piastre TSA.

13 – LIMITI DEL METODO

- Il recupero e l'identificazione della *Yersinia* patogena possono essere influenzati dal tipo di campioni, dall'arricchimento e dal terreno di coltura, dal livello e dal tipo di microflora di fondo, dal livello della *Yersinia* patogena e non patogena, dal sierotipo della *Yersinia* patogena presente negli alimenti e dalla perdita dei geni di virulenza durante l'incubazione.⁶





- Il brodo ITC funziona bene per il patogeno *Y. enterocolitica* sierotipo O:3 ma è meno appropriato per altri sierotipi.⁴
- Nelle indagini sui focolai di origine alimentare, la procedura di arricchimento a freddo potrebbe essere necessaria per integrare la procedura generale.⁵

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura, il supplemento e i flaconi pronti all'uso 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. Ticarcillin Irgasan Antimicrobic Supplement è classificato come pericoloso. 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 quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- I flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave seguita da aggiunta asettica di supplementi.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- Ogni flacone di questo terreno di coltura è monouso.
- 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 +10°C /+30°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).

Supplemento liquido

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, la soluzione deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso eliminare la soluzione che dovesse presentare segni di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

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). Secondo Curtis et al. il terreno completo auto-preparato in flaconi può essere conservato almeno 1 mese a 2-8°C in contenitori con tappo a vite.⁴

16 - BIBLIOGRAFIA

- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 8: *Yersinia enterocolitica*. Rev 10/2017
- Petersen MJ, Gladney LM, Schriefer ME. *Yersinia*. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015.
- Wauters G, Goossens V, Janssens M, Vandepitte J. New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. Appl Environ Microbiol. 1988; 54: 851–854.
- Curtis GDW, Baird RM. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology: Additional Monographs (II). Proceedings of the 6th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Heidelberg 30 March-3 April, 1992. Int J Food Microbiol 1993; 17:260-1.
- ISO 10273:2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*.
- American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed. 2015. APHA, Washington, DC.





Biolife

Istruzioni per l'uso

ST-4240060 rev 5 05/2023 page 4 / 4

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF	LOT Numero di lotto	Monouso	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	05/2023

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



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milan, Italy.
Tel. +39 02 25209.1, E-mail: mktg@biolifeitaliana.it
web: www.biolifeitaliana.it