



AZIDE MALTOSI AGAR KF

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

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base e piastre pronte all'uso per la determinazione ed il conteggio degli enterococchi nelle acque e negli alimenti.

2 - COMPOSIZIONE

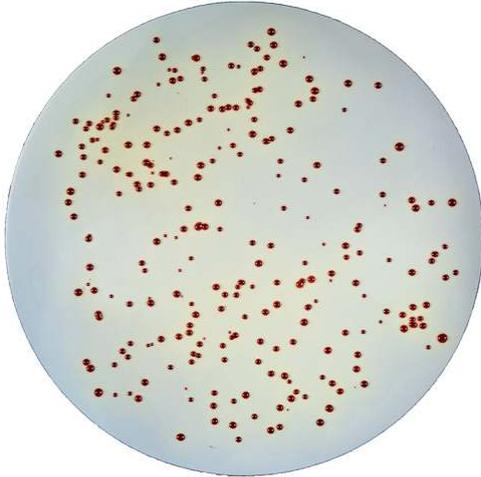
FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

AZIDE MALTOSI AGAR KF – TERRENO IN POLVERE

Proteose Peptone	10 g
Estratto di lievito	10 g
Sodio cloruro	5 g
Sodio glicerofosfato	10 g
Maltosio	20 g
Lattosio	1 g
Agar	15 g
Sodio azide	400 mg
Bromocresolo porpora	15 mg

AZIDE MALTOSI AGAR KF – PIASTRE PRONTE

Proteose Peptone	10 g
Estratto di lievito	10 g
Sodio cloruro	5 g
Sodio glicerofosfato	10 g
Maltosio	20 g
Lattosio	1 g
Agar	15 g
Sodio azide	400 mg
Bromocresolo porpora	15 mg
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro	100 mg
Acqua purificata	1000 mL



Azide Maltose Agar KF: *Enterococcus faecalis* colonies su membrana filtrante

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

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Azide Maltose Agar KF, addizionato di TTC è preparato secondo la formula sviluppata da Kenner, Clark e Kabler (Kenner-Faecal KF Medium)¹, per l'isolamento selettivo degli streptococchi fecali dalle acque superficiali con metodo della semina diretta o delle membrane filtranti.

Il terreno è raccomandato dagli Standard Methods^{2,3} per l'isolamento ed il conteggio degli streptococchi fecali nelle acque e negli alimenti con la tecnica delle membrane filtranti o per inclusione.

Il gruppo degli streptococchi fecali è stato considerato per lungo tempo un efficace indicatore di contaminazione fecale per gli ecosistemi acquatici; sebbene alcuni autori considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali, *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo è stato oggetto di numerose definizioni.⁴

Con il termine Streptococchi fecali è stato indicato un gruppo di microrganismi eterogeneo sia dal punto di vista tassonomico sia ecologico, raggruppati insieme sulla base della morfologia microscopica, della reattività alla colorazione di Gram e della assenza dell'enzima catalasi. Gli studi degli anni 80 hanno suddiviso il genere *Streptococcus*, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridazione del DNA, in tre generi geneticamente diversi (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*), di cui i primi due comprendono specie intestinali o di origine fecale.

Il genere *Enterococcus* include gli streptococchi di gruppo D di Lancefield che condividono determinate proprietà biochimiche e hanno un'ampia gamma di tolleranze a condizioni avverse (capacità di crescere in cloruro di sodio al 6,5%, pH 9,6 e 45 °C); queste caratteristiche fenotipiche sono comunque ascrivibili alla maggioranza ma non a tutte le specie. La tassonomia del genere è in continua evoluzione: il genere, sulla base dell'analisi delle sequenze di rRNA 16S, comprende, a tutt'oggi, 79 specie e 3 sottospecie.⁵

Gli enterococchi possono essere trovati nel suolo, nell'acqua, nei latticini, negli alimenti e nelle piante ed includono specie di dimostrata provenienza intestinale (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans/hirae*, *E. cecorum*) altre di cui l'origine esclusivamente intestinale non è stata completamente provata (*E. raffinosus*, *E. dispar*, *E. flavescens*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. sulphureus*).⁶⁻⁸

All'interno del genere *Streptococcus*, solo *S. bovis* e *S. equinus* sono considerati veri streptococchi fecali. Queste due specie di streptococco si trovano principalmente negli animali.

La denominazione Streptococchi di gruppo D, per indicare gli streptococchi fecali, non è da considerare attendibile in quanto l'antigene del gruppo D di Lancefield è prodotto da *Enterococcus*, da *Pediococcus* e da alcuni streptococchi.

Come conseguenza di questa complessità tassonomica e dei molteplici habitat degli enterococchi, maggiore attenzione dovrebbe essere prestata alla loro identificazione a livello di specie per discriminare quelle veramente intestinali di origine animale, umana ed a sangue caldo ed al loro ruolo come indicatori dell'inquinamento fecale, per la valutazione della qualità igienica delle acque e degli alimenti.

Nel terreno di coltura Azide Maltose Agar KF, il Proteose Peptone e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine, aminoacidi ed elementi in tracce per la crescita microbica; il lattosio ed il maltosio sono carboidrati fermentabili: la produzione di acidi induce il viraggio dell'indicatore di pH bromocresolo porpora verso il giallo; il sodio cloruro contribuisce al bilanciamento osmotico del terreno; la sodio azide è un agente selettivo attivo sulla inibizione della crescita dei batteri Gram negativi; il trifeniltetrazolio cloruro addizionato al terreno di base è ridotto, durante la crescita batterica, a formazano, un pigmento insolubile che colora di rosa-rosso le colonie.



4-PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 71,4 g in 1000 mL di acqua purificata fredda; riscaldare fino all'ebollizione e far bollire per cinque minuti (o autoclavare 10 minuti a 121°C, se è richiesta una selettività totale). Raffreddare a 50°C e aggiungere asepticamente 10 mL di TTC 1% Solution (REF 42111801). Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili da 55 o 90 mm o tenere a 45°C se si usa il metodo di semina per inclusione.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	terreno limpido di colore rosa
pH (20-25°C)	7,2 ± 0,2

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Azide Maltose Agar KF	Terreno in polvere	4011072	500 g (7 L)
Azide Maltose Agar KF	Piastre pronte all'uso	491107	3 x 10 piastre ø 55 mm

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi, beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8-CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni di acqua ed alimenti fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9-PROCEDURA DELL'ANALISI

Metodo d'impiego con membrane filtranti

- Filtrare un volume adeguato di acqua sulla membrana in base al numero di enterococchi previsto. Se la densità batterica del campione non è nota, filtrare diversi volumi o diluizioni per ottenere una piastra con un numero di colonie contabili (20-60 UFC/piastra).
- Posizionare con le precauzioni dell'asepsi il filtro a membrana usato per raccogliere il campione d'acqua sulla superficie dell'agar, in modo da evitare la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie dell'agar.
- Incubare a 35-37°C per 48 ore.

Metodo d'impiego con il conteggio in piastra con semina per inclusione

- Inserire 1 mL delle diluizioni decimali del campione in piastre di diametro 90 mm, in duplicato;
- Aggiungere a ciascuna piastra circa 20 mL di terreno raffreddato a 45°C e miscelare con cura l'inoculo con l'agar
- Incubare a 35°C per 48 ore.

10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie, se necessario facendo uso di uno stereomicroscopio 15x. Contare e registrare come enterococchi le colonie da rosa a rosse spesso circondate da un alone giallo.

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>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°X 48 H-A	Crescita con colonie rosa-ciclamino
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	37°X 48 H-A	Crescita con colonie rosa-ciclamino
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	37°X 48 H-A	Crescita inibita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°X 48 H-A	Crescita inibita

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

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Azide Maltose Agar KF viene testato per la produttività e la 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: *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 19434, *E. hirae* ATCC 8043, *E. casseliflavus* ceppo selvatico CB ENT7.1, *E. gallinarum* ATCC 49573, *S. bovis* ATCC 33317. Dopo incubazione a 37°C per 48 ore, vengono valutate la quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie: i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie di colore rosa-rosso.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non-target: *S. salivarius* ATCC 7073, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *L. acidophilus* ATCC 314. La crescita dei ceppi non-target è totalmente inibita dopo incubazione a 37°C per 48 ore.

13-LIMITI DEL METODO

- KF Agar è risultato inadatto per l'esame dell'acqua marina perché *Vibrio alginolyticus* e altri bacilli Gram-negativi presenti in questo ambiente crescono bene e producono colonie rosse identiche a quelle degli streptococchi fecali.⁹
- Molti ceppi di *S. bovis* e di *S. equinus* sono inibiti dalla sodio azide.
- Un eccessivo riscaldamento del terreno può indurre un abbassamento del pH ed una diminuita produttività del terreno.¹⁰

14-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è destinato ai 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 in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Azide Maltose Agar KF disidratato è classificato come pericoloso dalle norme vigenti. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- 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 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 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).

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 MacFaddin il terreno senza TTC preparato in laboratorio in flaconi con tappo a vite può essere conservato a +2°C/+8°C per circa 6 mesi.⁹

Piastre pronte

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C/+8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

16-BIBLIOGRAFIA

- Kenner,BA, Clark HF, Kabler, PW. Fecal Streptococci I Cultivation and enumeration of Streptococci in surface waters. *App Microbiol*, 1961; 9:15
- APHA Standard Methods for Examinations of Water and Waste-water, 16 th edition, 1985
- APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., 2001
- APAT-CNR-IRSA: Metodi per la determinazione di microrganismi indicatori d'inquinamento e di patogeni. 7040. Streptococchi fecali ed enterococchi.
- Meier-Kolthoff, J.P., Sardà Carbasse, J., Peinado-Olarte, R.L. and Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, 50, D801-D807; DOI: 10.1093/nar/gkab902
- Hardie DJM, Whiley RA. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. *J App Microbiol Symposium Supplement*, 1997; 83:1S-11S
- Lebreton F, Willems R.J.L, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. 2014.
- Pinto B, Pierotti R, Canale G. Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Lett in App Microbiol* 1999 ; 29 :258-263
- Yoshpe-Purer Y. Evaluation of media for monitoring fecal streptococci in seawater. *Appl Environ Microbiol*. 1989 Aug; 55(8): 2041-2045
- MacFaddin, Jean F. (1985). Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	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 7	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2022
Revisione 8	Aggiornamento dei capitoli 1, 4, 5, 14	01/2023

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

