

ChromArt

# CHROMOGENIC COLIFORM AGAR ISO FORMULATION

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso



Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation.  
*Escherichia coli* : colonie blu; *Citrobacter freundii* : colonie rosse

## 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno cromogenico per il conteggio di *Escherichia coli* e batteri coliformi con tecnica di filtrazione su membrana in acque con scarsa flora contaminante, secondo ISO 9308-1

## 2 – COMPOSIZIONE

### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA \*

|   |        |
|---|--------|
| Idrolizzato enzimatico di caseina         | 1,00 g |
| Estratto di lievito                       | 2,00 g |
| Sodio cloruro                             | 5,00 g |
| Sodio fosfato monobasico diidrato         | 2,20 g |
| Sodio fosfato bibasico                    | 2,70 g |
| Sodio piruvato                            | 1,00 g |
| Sorbitolo                                 | 1,00 g |
| Triptofano                                | 1,00 g |
| Tergitol® 7                               | 0,15 g |
| Salmon-β-galattoside                      | 0,20 g |
| X-β-glucuronide                           | 0,10 g |
| Isopropyl-β-D-tiogalattopiranoside (IPTG) | 0,10 g |
| Agar                                      | 10,6 g |

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

## 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'inquinamento fecale è la causa principale delle malattie trasmesse tramite l'acqua, poiché la maggior parte degli agenti patogeni associati alla trasmissione risiede nelle feci umane e degli animali a sangue caldo. L'esame di campioni d'acqua per la presenza di *E. coli* e batteri coliformi fornisce un'indicazione di tale inquinamento.

Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation è un terreno selettivo e differenziale per la rilevazione e il conteggio simultaneo di *E. coli* positivi alla β-glucuronidasi e di batteri coliformi positivi alla β-D-galattosidasi da campioni d'acqua a bassa carica batterica, come l'acqua potabile, l'acqua di piscina disinfettata o l'acqua proveniente da impianti di trattamento dell'acqua potabile, in conformità alla norma ISO 9308-1.<sup>1,2</sup>

L'idrolizzato enzimatico di caseina fornisce azoto, carbonio, aminoacidi e minerali per la crescita microbica, mentre l'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico, mentre i fosfati fungono da tampone del terreno. Sorbitolo e sodio piruvato stimolano una rapida crescita batterica e aiutano il recupero delle cellule stressate. Il tergitol 7 è un tensioattivo che agisce come agente selettivo, inibendo moderatamente la crescita dei batteri Gram-positivi.

Il riconoscimento dei batteri coliformi si basa sulla capacità della β-D-galattosidasi di scindere il substrato salmone-β-D-galattoside con la formazione di colonie rosso salmone. Il riconoscimento di *E. coli* si basa sulla rilevazione di due attività enzimatiche, la β-D-glucuronidasi e la β-D-galattosidasi, che scindono i substrati cromogenici salmone-β-D-galattoside e X-β-glucuronide, con la formazione di colonie blu scuro. L'idrolisi di X-GAL è potenziata da IPTG, un induttore dell'operone lattosio.

## 4A - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 27,1 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente fino a completa dissoluzione. Non autoclavare, non surriscaldare. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili formando uno strato di almeno 4 mm. Dopo l'ebollizione può verificarsi una certa torbidità, che normalmente scompare quando la temperatura scende a 47-50°C e non influisce sulle prestazioni del terreno.

## 4B - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONI

Sciogliere il contenuto del flacone in autoclave a 100 ± 2°C o a bagnomaria a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere posto in un contenitore contenente acqua, che viene appoggiato su una piastra calda e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento per consentire il cambio di pressione. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno in piastre Petri sterili, in condizioni asettiche.

## 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere

Aspetto del terreno in flacone e in piastra

pH finale (20-25 °C)

Fine granulometria omogenea, beige

giallo chiaro, limpido o leggermente opalescente

6,8 ± 0,2



**6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI**

| Prodotto                                  | Tipo                          | REF     | Confezione            |
|---|-------------------------------|---------|-----------------------|
| Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation | Terreno di coltura in polvere | 4012972 | 500 g (18,4 L)        |
| Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation | Piastre pronte all'uso        | 491297  | 3 x 10 plates ø 55 mm |
| Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation | Flaconi pronti all'uso        | 5112972 | 6 x 100 mL            |

**7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI**

Bagnomaria, anse sterili, tamponi, pipette, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, piastre di Petri, beute, filtri a membrana, mezzi di coltura e reagenti ausiliari.

**8 – CAMPIONI**

Campioni di acqua con bassa carica batterica, come acqua potabile, acqua di piscina disinfettata o acqua proveniente da impianti di trattamento dell'acqua potabile. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle norme internazionali applicabili.

**9 – PROCEDURA DELL'ANALISI**

Filtrare 100 mL (o altri volumi, ad esempio 250 mL per l'acqua in bottiglia) di campione utilizzando un filtro a membrana di solito di circa 47 mm o 50 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro nominale dei pori di 0,45 µm e, preferibilmente, con linee di griglia. Il volume minimo per la filtrazione è di 10 mL per il campione e per le sue diluizioni, per garantire una distribuzione uniforme dei batteri sul filtro a membrana.

Dopo la filtrazione, posizionare il filtro a membrana sulla superficie del terreno, assicurandosi che non vi sia aria intrappolata sotto, capovolgere la piastra Petri e incubare a 36 ± 2 °C per 21-24 ore.

**10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

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

Tutte le colonie da rosa a rosse (positive alla reazione della β-D-galattosidasi) come presunti batteri coliformi diversi da *E. coli*.

Tutte le colonie da blu scuro a viola (positive alle reazioni β-D-galattosidasi e β-D-glucuronidasi) come *E. coli*.

Per evitare risultati falsi positivi, causati da batteri ossidasi positivi, ad esempio *Aeromonas* spp, le colonie presunte devono essere confermate da una reazione ossidasi negativa (Strisce per test ossidasi, ref. 191040ST).

Eseguire il test dell'ossidasi preferenzialmente su tutte o almeno 10 colonie selezionate di colore rosa-rosso (batteri coliformi, diversi da *E. coli*): il test deve risultare negativo.

La conta dei batteri coliformi totali è la somma di tutte le colonie rosa-rosse negative all'ossidasi più tutte le colonie blu scuro-viola.

**11 – CONTROLLO QUALITÀ**

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche.

Tuttavia, è comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

| CEPPO DI CONTROLLO              | INCUBAZIONE T° / T / ATM | RISULTATI ATTESI           |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 25922       | 34-38°C/21-24H/A         | crescita, colonie blu      |
| <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048  | 34-38°C/21-24H/A         | crescita, colonie rosa     |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 | 34-38°C/21-24H/A         | crescita, colonie incolori |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 19433   | 34-38°C/21-24H/A         | inibito                    |

A: incubazione in aerobiosi; 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 Cromogenic Coliform Agar ISO Formulation disidratato e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739, *E. aerogenes* ATCC 13048, *C. freundii* ATCC 43864; i filtri a membrana posti sul terreno, vengono inoculati con diluizioni decimali in soluzione fisiologica della sospensione batterica e incubati a 35-37°C per 21-24 ore. Le colonie vengono contate sul lotto di prova (TB) e sul lotto di riferimento (RB) e viene calcolato il rapporto di produttività ( $Pr = UCF_{TB} / UCF_{RB}$ ). Se  $Pr \geq 0,7$  e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità viene testata con tecnica semiquantitativa con *P. aeruginosa* ATCC 10145. Dopo incubazione a 35-37°C per 21-24 ore, *P. aeruginosa* cresce con colonie incolori.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con gocce di opportune diluizioni decimali di una sospensione di 0,5 McFarland del ceppo Gram positivo non target *E. faecalis* ATCC 19433. La crescita del ceppo non target è totalmente inibita.

**13 – LIMITI DEL METODO**

- È stato riportato che circa il 40% delle specie di *Shigella*, vari bio-sierotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* del sottogenere I) possono essere positivi alla β-glucuronidasi; solo eccezionalmente questo test è positivo con ceppi di *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).<sup>3-5</sup>
- Circa il 3-4% degli *E. coli* è negativo alla β-glucuronidasi, in particolare i ceppi di *E. coli* O157.<sup>1,4</sup> Di conseguenza, questi ceppi, essendo positivi alla β-galattosidasi, cresceranno con colonie rosso-rosa e saranno contati come coliformi.<sup>1</sup>
- Oltre a esprimere la β-D-glucuronidasi, *E. coli* è in grado di produrre indolo dal triptofano. Pertanto, in caso di dubbio sulla presenza di colonie di *E. coli* sul terreno di coltura primario, il test dell'indolo può essere utilizzato come ulteriore conferma.<sup>1</sup>
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre si differenziano in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, a partire da colture pure, per una completa identificazione.





#### 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per 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 disidratati 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](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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione all'apertura dei flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno in flacone. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- I flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni non utilizzati 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 le Schede di Sicurezza 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 dei prodotti, 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

##### Piastre pronte all'uso

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. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

##### 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).

##### Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

In accordo alla ISO 9301-1 le piastre possono essere conservate a una temperatura di  $5 \pm 3$  °C e al riparo dalla luce, per al massimo un mese.











#### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. ISO 9308-1:2014 Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
2. ISO 9308-1:2014/AMD 1:2016 Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora — Amendment 1
3. Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl- D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of E. coli. J Clin Microbiol 1984; 19 :172.
4. Robison BJ. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 48:285-288
5. Kaluzewski SD, Tomczuk D. Evaluation of the Usefulness of Tests for Production of Beta-D-glucuronidase and Propylene Glycol Utilization for the Differentiation of Enterobacteriaceae Rods. Med Dosw Mikrobiol, 1995; 47:155-68.





### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

|   |  |  |  |   |  |
|---|--|--|--|---|--|
|  REF<br>Numero di catalogo |  LOT<br>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   |  Monouso                      |

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

| Versione    | Descrizione delle modifiche              | Date    |
|-------------|--|---------|
| Revisione 4 | Aggiornamento del contenuto e del Layout | 2023/01 |

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

