

m-FAECAL COLIFORM AGAR (m-FC Agar)

Terreno di coltura in polvere e piastre pronte all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

m-Faecal Coliform Agar è utilizzato con acido rosolico per la coltivazione e il conteggio dei coliformi fecali mediante la tecnica della filtrazione su membrana.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

| | |
|---------------------|--------|
| Triptosio | 10,0 g |
| Peptocomplex | 5,0 g |
| Estratto di lievito | 3,0 g |
| Sodio cloruro | 5,0 g |
| Lattosio | 12,5 g |
| Sali biliari N° 3 | 1,5 g |
| Blu anilina | 0,1 g |
| Agar | 13,0 g |

Piastre pronte all'uso

| | |
|---------------------|---------|
| Tryptose | 10,0 g |
| Peptocomplex | 5,0 g |
| Estratto di lievito | 3,0 g |
| Sodio cloruro | 5,0 g |
| Lattosio | 12,5 g |
| Sali biliari N° 3 | 1,5 g |
| Blu anilina | 0,1 g |
| Agar | 13,0 g |
| Acido rosolico 1% | 10 mL |
| Acqua purificata | 1000 mL |

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I coliformi fecali si trovano nel tratto gastrointestinale e nelle feci degli animali a sangue caldo e possono essere differenziati dai coliformi provenienti da fonti ambientali per la loro capacità di crescere a 44,5 °C.

L'm-Faecal Coliform Agar è preparato secondo la formulazione riportata da Geldrich et al. nel 1965¹ per il conteggio dei coliformi fecali utilizzando la tecnica della filtrazione su membrana senza arricchimento preliminare. Il terreno è raccomandato da molte autorità internazionali per il conteggio dei coliformi fecali con la tecnica della filtrazione su membrana.²⁻⁴ I coliformi fecali (o batteri coliformi termotolleranti) sono spesso utilizzati come indicatori dell'inquinamento fecale, sebbene siano un indicatore meno specifico della contaminazione fecale rispetto all' *Escherichia coli*, poiché possono talvolta derivare da fonti non fecali, soprattutto nei climi tropicali.⁵

Il triptosio e il peptocomplex forniscono azoto e minerali per la crescita microbica, l'estratto di lievito è una fonte di complesso di vitamine B per la stimolazione della crescita, il lattosio è un carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. I sali biliari N° 3 e il blu di anilina inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi. L'elevata temperatura di incubazione rende il terreno più selettivo. Il blu di anilina e l'acido rosolico costituiscono il sistema indicatore del terreno.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 50 g in 1000 mL di acqua depurata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente e aggiungere 10 mL di una soluzione all'1% di acido rosolico (REF 4211901) in NaOH 0,2 N e continuare a bollire per 1 minuto. Non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a 47-50 °C, mescolare bene e versare in piastre sterili per la tecnica MF (55 mm di diametro).

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

| | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Aspetto della polvere | Fine granulometria omogenea, gialla |
| Aspetto del terreno in provetta | grigio-viola, limpido |
| pH finale (20-25 °C) | 7,4 ± 0,2 |

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|------------------------------------|------------------------|---------|-----------------------|
| m-Faecal Coliform Agar (m-FC Agar) | Terreno disidratato | 4014872 | 500 g (10 L) |
| m-FC Agar | Piastre pronte all'uso | 491487 | 3 x 10 plates ø 55 mm |

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre di Petri sterili, filtri a membrana, acido rosolico (REF 4211901), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Campioni d'acqua. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.





9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

1. Filtrare un volume adeguato di acqua sulla membrana in base al numero di coliformi fecali previsto. Se la densità batterica del campione non è nota, filtrare diversi volumi o diluizioni per ottenere una piastra contabile (20-60 UFC/piastra).
2. Utilizzando una tecnica asettica, posizionare un tampone assorbente sterile in ogni piastra di coltura e prelevare almeno 2 mL di brodo. Rimuovere con cura l'eccesso di liquido dalla piastra di coltura decantando la piastra.
3. Entro 30 minuti riporre le piastre in sacchetti di plastica e incubare, per immersione, in un bagno d'acqua a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie. Contare e registrare le colonie con varie tonalità di blu come coliformi fecali. Le colonie di coliformi non fecali sono grigie, crema o rosa.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore finale 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.

CEPPI DI CONTROLLO

E. coli ATCC 25922

E. faecalis ATCC 19433

INCUBAZIONE T° / T - ATM

44,5° / 24 H-A

44,5° / 24 H-A

RISULTATI ATTESI

crescita con colonie blu

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 di tutti i lotti di m-Faecal Coliform Agar (TB) viene valutato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività viene testata con un metodo quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 ed *E. coli* ATCC 8739: i filtri arrotolati su tamponi vengono inoculati con diluizioni decimali di una sospensione di colonie in soluzione salina e incubati a 44°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: $\text{CFU}_{\text{TB}}/\text{CFU}_{\text{RB}}$). Se $\text{Pr} \geq 0,7$ e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie blu), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività e la specificità sono valutate con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *C. freundii* ATCC 8090, *S. Typhimurium* ATCC 14024. La crescita dei ceppi Gram-positivi è totalmente inibita, mentre la crescita di *K. pneumoniae* e *C. freundii* è parzialmente inibita, la crescita di *S. Typhimurium* non è inibita e il ceppo cresce con colonie rosa.

13 – LIMITI DEL METODO

- Poiché la temperatura di incubazione è critica, si raccomanda l'uso di colture MF sommerse e impermeabilizzate o l'uso di un incubatore che sia in grado di mantenere la temperatura a $44,5^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ in tutta la camera per un periodo di 24 ore.²
- Esistono limitazioni all'interpretazione dei risultati dei coliformi termotolleranti provenienti da acque termali e da campioni di effluenti di cartiere, in quanto la *Klebsiella* termotollerante è predominante e non è indicativa di una fonte fognaria. Circa il 60%-80% di tutte le *Klebsiella* provenienti da feci e campioni clinici sono positive al test dei coliformi termotolleranti e sono *K. pneumoniae*.²

14 – PRECAUZIONI E 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 in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed 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.
- 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

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a $+10^\circ\text{C}$ / $+30^\circ\text{C}$ 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).













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).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Geldreich EE, Clark HF, Huff CB, Best LC. Faecal coliform organisms medium for membrane filtration technique. J Am Water Works Assoc 1965; 57:208.
2. APHA Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2017.
3. AOAC Official methods of analysis, 18th ed., AOAC International. Gaithersburg, Md. 2007
4. U.S. Environmental Protection Agency. Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water. EPA-814B-92-002. Office of Ground Water and Technical Support Division, USEPA, Cincinnati, Ohio.
5. Cisneros BJ, in Treatise on Water Science, 4.06.4.1.5 Biological indicators, 2011.

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 |  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.

