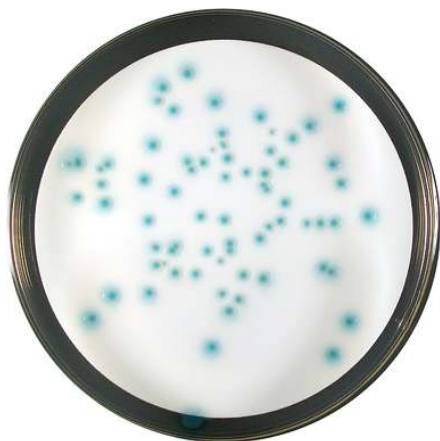


ChromArt

EC X-GLUC AGAR (CHROMOGENIC E. COLI)

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

 EC X-GLUC Agar:
E. coli ATCC 25922 su membrana filtrante

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Terreno cromogeno per il conteggio di *Escherichia coli*.

2 - COMPOSIZIONE
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA) *

Triptone	20,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Sali biliari n° 3	1,50 g
Sodio fosfato bibasico	5,00 g
Potassio fosfato monobasico	1,50 g
Sodio cloruro	5,00 g
5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucuronide (X-GLUC)	0,06 g
Triptofano	1,00 g
Agar	12,00 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 EC X-GLUC Agar (Chromogenic E. coli) è un terreno selettivo e differenziale per l'enumerazione e l'identificazione di *Escherichia coli*. Il terreno è incluso nella norma UNICHIM n. 1185¹ per la rilevazione di *E. coli* nell'acqua con la tecnica MF e nella rassegna dei metodi per l'acqua ISSN:1125-2464².

 Il triptone fornisce azoto, carbonio, aminoacidi e minerali per la crescita microbica, 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 mezzo. I sali biliari agiscono come agente selettivo, inibendo la crescita dei batteri Gram-positivi. Il rilevamento di *E. coli* si basa sulla capacità della β-D-glucuronidasi di scindere il substrato X-glucuronide con la formazione di colonie blu-verdi.

Le colonie coltivate su EC X-GLUC Agar possono essere testate direttamente per l'indolo depositando una goccia di reagente di Kovacs (REF 19171000) e osservando il cambiamento di colore al rosso del reagente.

 Natali et al.³ hanno valutato EC X-GLUC Agar con ceppi microbici isolati da campioni d'acqua e hanno concluso che EC X-GLUC Agar dà risultati migliori di Levine EMB Agar e MacConkey Agar MUG nella rilevazione di *E. coli*.

4A- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 51 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione fino a completa soluzione, quindi autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50°C e distribuire in piastre di Petri sterili.

4B- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONE

Liquefare il contenuto del flacone in autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnomaria a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un recipiente con acqua, posto su una piastra riscaldante e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno di coltura in piastre di Petri sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea di colore beige
Aspetto del terreno in soluzione, in piastra ed in flacone	terreno leggermente opalescente, di colore beige
pH finale a 20-25 °C	7,0 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
EC X-GLUC Agar (Chromogenic E. coli)	Terreno in polvere	4019682	500 g (9,8 L)
EC X-GLUC Agar (Chromogenic E. coli)	Piastre pronte all'uso	497102	30 piastre 55 mm
EC X-GLUC Agar (Chromogenic E. coli)	Flaconi pronti all'uso	5119672	6 flaconi da 100 mL

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse e pipette sterili da microbiologia, membrane ad apparati per la filtrazione del campione, terreni di coltura e reagenti accessori.

8 - CAMPIONI

Possono essere utilizzati campioni di acque e campioni della filiera alimentare. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni e gli Standard internazionali pertinenti.





9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Metodo di filtrazione su membrana

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 griglia. Il volume minimo per la filtrazione è di 10 mL di campione o di sue diluizioni per garantire una distribuzione uniforme dei batteri sul filtro a membrana.

Dopo la filtrazione, posizionare il filtro a membrana su EC X-GLUC Agar, assicurandosi che non vi siano bolle d'aria, capovolgere le piastre e incubare a 44 ± 0,5 °C per 21-24 ore.

Metodo per inclusione

Distribuire 1 mL delle diluizioni decimali del campione nelle piastre. Aggiungere circa 15 mL di EC X-GLUC Agar pre-raffreddato. Mescolare bene l'inoculo con il terreno. Incubare a 44 ± 0,5 °C per 21-24 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica delle colonie. Contare come *E. coli* le colonie blu o verde-blu, confermate dal test dell'indolo.

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, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922:	44°C / 24 ore / A	crescita, colonie verde-blu, indolo positive
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	37°C / 24 ore / A	crescita, colonie incolori, indolo negative
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°C / 24 ore / A	inibito

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

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di EC X-GLUC Agar disidratato e pronto all'uso vengono testati per verificare la produttività, la specificità e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato e con Tryptic Soy Agar.

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 ed *E. coli* ATCC 8739; le piastre di EC X-GLUC Agar vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 44°C per 21-24 ore. Le colonie vengono enumerate sul lotto di prova (TB) e su Tryptic Soy Agar (TSA) e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr=UFC_{TB}/UFCU_{TSA}). Se Pr è ≥ 0,5 e se la morfologia ed il colore delle colonie sono tipici (colonie blu, indolo positive), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità viene testata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con *C. freundii* ATCC 8090, *E. aerogenes* ATCC 13048 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, *P. aeruginosa* cresce con colonie verde-beige pallido mentre *C. freundii* ed *E. aerogenes* crescono con colonie incolori, indolo negative.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con gocce di adeguate diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland del ceppo Gram positivo *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-serotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* sottogenere I) possono essere positivi alla β-glucuronidasi; solo eccezionalmente questo test è positivo con ceppi di *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).⁴⁻⁶
- Circa il 3-4% degli *E. coli* sono β-glucuronidasi negativi, in particolare i ceppi di *E. coli* O157.^{6,7}
- 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, il test dell'indolo può essere utilizzato come ulteriore conferma.⁷

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono da impiegare per controlli microbiologici, sono per uso professionale e devono essere usati 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 le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura in polvere e pronto all'uso 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 questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare i prodotti 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 nella preparazione del terreno.
- Fare attenzione quando si aprono i flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Se si utilizza una piastra e/o un bagno d'acqua, far bollire abbastanza a lungo da sciogliere l'intero terreno di coltura.
- Indossare guanti per la protezione dal calore durante la liquefazione del terreno. 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 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 non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Il terreno pronto in flacone è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.





- 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 di base non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti 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 in polvere

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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre/flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura ed imballaggio).

Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°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).

Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Dopo l'apertura della scatola, i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato). Il terreno in flacone può essere sciolto a 100°C per una sola volta.

16 - BIBLIOGRAFIA

- Unichim n° 1185: 2000.
- Bonadonna L. *Escherichia coli* nelle acque significato sanitario e metodologie di analisi. ISSN:1125-2464, 2001
- Natali, P., Neri, A. Rossi, P., Ferrari, M. (1999) *Biologi Italiani*, n° 10/99, 20-22
- Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl- D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *E. coli*. *J Clin Microbiol* 1984; 19 :172.
- Robison BJ. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984; 48:285-288
- 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.
- 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.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF or 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> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Modifiche del contenuto dei capitoli "Limiti del metodo", "Precauzioni ed avvertenze", "Conservazione e validità", "Bibliografia" e del layout.	07/2021
Revisione 5	Modifiche dei capitoli 3, 9, 11, 12, 15, 16. Inserimento del capitolo "Caratteristiche delle prestazioni".	01/2023

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

