

MODIFIED SCHOLTENS' AGAR BASE (MSA) CALCIUM CHLORIDE SOLUTION

Terreno di coltura in polvere e in flacone e supplemento

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base, in accordo con la norma ISO 10705-2, per l'enumerazione dei colifagi somatici nelle acque.

2-COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

TERRENO IN POLVERE E PRONTO ALL'USO IN FLACONE

Peptone	10,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Estratto di carne	12,00 g
Sodio cloruro	3,00 g
Sodio carbonato	0,75 g
Magnesio cloruro (6H ₂ O)	0,60 g
Agar	14,00 g

CALCIUM CHLORIDE SOLUTION (1M)

SUPPLEMENTO LIQUIDO – CONTENUTO: 30 ML

Calcio Cloruro	3,3 g
Acqua	30 mL

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

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Modified Scholtens' Agar base è preparato in accordo alla formulazione proposta dalla norma ISO 10705-2¹ per l'enumerazione dei colifagi somatici nelle acque. I colifagi somatici sono virus che appartengono alla grande famiglia dei batteriofagi: questi sono in grado di infettare selettivamente i batteri al fine di potersi replicare, immettendo il proprio DNA all'interno della cellula batterica. In seguito, il virus inizia a moltiplicarsi all'interno del batterio provocandone la lisi, che sarà visibile nel terreno di coltura (placca). I colifagi somatici sono indicatori di inquinamento fecale nelle acque, grazie alla capacità di attaccare specificatamente la specie *Escherichia coli*.

Modified Scholtens' Agar è un terreno di coltura usato come terreno di substrato. Il peptone, l'estratto lievito e l'estratto di carne forniscono i nutrienti necessari per *Escherichia coli* (ospite), il sodio cloruro, magnesio cloruro e calcio cloruro sono bilanciati per mantenere l'equilibrio osmotico senza interferire nella propagazione dei fagi.

4A-PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 43,35 g di in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione per sciogliere completamente il terreno e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare, termostatare a 45-50°C ed aggiungere 6 mL di Calcium Chloride Solution (REF 421020). Dispensare 20 mL in piastre da 90 mm o 50 mL in piastre da 150 mm.

4B-PREPARAZIONE DEL TERRENO PRONTO ALL'USO IN FLACONE

Sciogliere il contenuto del flacone in un'autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnomaria termoregolato a 100°C. In alternativa, il flacone può essere posto in un recipiente contenente acqua, che viene posta su una piastra riscaldante e portata ad ebollizione; allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare il terreno a 45-50°C ed aggiungere la Calcium Chloride Solution presente nella confezione in ragione di 0,6 mL per 100 mL di terreno. Distribuire in piastre sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere
Aspetto del terreno in flacone
pH (20-25°C)

Fine granulometria omogenea, gialla
Limpido, beige
7,2 ± 0,5

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Modified Scholtens' Agar Base (MSA)	Terreno di coltura in polvere	4017482	500 g (11,5 L)
		4017484	5 kg (115 L)
Modified Scholtens' Agar (MSA)	Kit: Flaconi pronti all'uso + Calcium Chloride Solution	511748K2	6 flaconi x 100mL di terreno + 1 fiala da 4 mL di soluzione Calcium Chloride 1M
		511748K3	6 flaconi x 200mL di terreno + 2 fiale da 4 mL di soluzione Calcium Chloride 1M

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8-CAMPIONI

Il metodo di analisi qui descritto, tratto dalla norma ISO 10705-2, è indicato per ogni tipo di acqua (naturale o reflua) e fanghi. Per il prelievo, il trasporto, la conservazione dei campioni e la coltura del ceppo ospite, attenersi alle buone pratiche di laboratorio e fare riferimento alle norme applicabili (ISO 8199, ISO 5667-1 e ISO 5667-3)²⁻⁴.

9-PROCEDURA DELL'ANALISI

Procedura standard per l'allestimento del test

Per l'isolamento dei colifagi somatici e la conta delle placche, in accordo con la ISO 10705-2¹, si consiglia di seguente metodo:

- Preparare il ceppo ospite come previsto dalla norma di riferimento.
- Preparare le piastre di Modified Scholtens' Agar come descritto.
- Preparare 50 mL di ssMSA (REF 401749) come da IFU, in caso di acque con elevata quantità di inquinanti, aggiungere Nalidixic Acid Solution (REF 4240067) per ottenere una concentrazione finale di 250mg/L.





4. Allestire varie diluizioni dell'acqua da trattare e dispensarne 1mL in provette, per ogni diluizione (si consiglia di allestire 2 provette per ogni diluizione, per rendere più precisa la conta delle placche)
5. Distribuire le diluizioni in provette contenenti 2,5mL di ssMSA.
6. Per ogni provetta aggiungere 1mL di coltura batterica del ceppo ospite (in caso di acque fortemente inquinate, che richiedono l'aggiunta del Nalidixic Acid Solution, utilizzare *Escherichia coli* WG5)
7. Distribuire tutto il contenuto della provetta sulle piastre e fare sì che l'inoculo copra tutta la superficie
8. Asciugare le piastre in incubatore col coperchio parzialmente aperto ed in seguito chiuderle, capovolgerle e incubare a 36 ± 2 °C per 18 ± 2 ore. Non sovrapporre più di sei piastre per volta.

10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le piastre vanno visionate entro 4 ore dal termine dell'incubazione e la conta delle placche va effettuata utilizzando una luce indiretta. Per avere un risultato accurato prendere in considerazione solo le piastre con un numero di placche compreso tra le 30 e le 300 unità ed infine applicare il metodo MPN.

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>Escherichia coli</i> ATCC 700078 (WG5)	37 ± 2 °C / 18-24H / A	Buona crescita, colonie tipiche
<i>Escherichia coli</i> ATCC 13706	37 ± 2 °C / 18-24H / A	Buona crescita, colonie tipiche

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Modified Scholtens' Agar (MSA) disidratato e in flacone viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato e con Tryptic Soy Agar (TSA).

La produttività viene testata con il metodo quantitativo con i ceppi target *Escherichia coli* ATCC 700078 (WG5) e *Escherichia coli* ATCC 13706: le piastre sono inoculate con diluizioni decimali di una sospensione batterica in soluzione fisiologica e incubate a 37°C per 18-24 ore.

Le colonie vengono contate sui lotti testati e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{MSA}/UFC_{TSA}). Se Pr è $\geq 0,7$ e se la morfologia delle colonie è tipica, i risultati sono accettabili e conformi alle specifiche.

13-LIMITI DEL METODO

- ISO 10705-2 descrive come contare le placche, tuttavia queste possono essere difficili da vedere. A tal proposito si può aggiungere TTC SOLUTION 1% (REF 42111801) nel ssMSA al fine di aumentare il contrasto tra la crescita batterica e l'unità formante placca
- La miscelazione del ssMSA con il ceppo ospite e l'acqua da trattare potrebbe provocare la formazione di grumi dovuti alle differenti temperature dei soluti. Accertarsi che tutti i composti e reagenti siano a temperatura simile. Nel caso si debba ricorrere al bagnomaria per ridisciogliere i grumi, impostare una temperatura di 45 ± 1 °C e riscaldare per non più di 10 minuti.

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 disidratati devono essere maneggiati con una protezione adeguata. 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.
- Fare attenzione quando si aprono i 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 sufficientemente a lungo per sciogliere l'intero terreno.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la procedura di liquefazione del terreno. Non mettere i flaconi caldi a contatto con il ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento poiché ciò potrebbe causare rotture del vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno può variare considerevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume del flacone.
- Il terreno in flacone qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- 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 dei prodotti 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 di coltura in polvere

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).

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 utilizzati 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'utente è responsabile dei processi di produzione e controllo qualità dei terreni preparati e della convalida della loro durata, in base al tipo e alle condizioni di conservazione (temperatura e imballaggio). Secondo ISO 10705-2, le piastre preparate possono essere conservate al buio e protette dall'evaporazione fino a 1 mese a 5 ± 3 °C.

16- BIBLIOGRAFIA

1. ISO 10705-2:2000 Water quality – Detection and Enumeration of bacteriophages, Part 2: enumeration of somatic coliphages
2. ISO 8199:2018 Water quality General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.
3. ISO 5667-1:2023 Water quality Sampling Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques
4. ISO 5667-3:2024 Water quality Sampling Part 3: Preservation and handling of water samples

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	 Monouso
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 0	Prima pubblicazione	05/2024
Revisione 1	Aggiornamento del contenuto	12/2024

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

