

ChromArt

CHROMOGENIC COLIFORM AGAR

Terreno cromogeno in polvere e piastre pronte all'uso


 Chromogenic Coliform Agar: *E. coli* colonie blu-grigio;
E. aerogens: colonie salmone

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Terreno cromogenico per la conta simultanea di *Escherichia coli* e batteri coliformi.

2 - COMPOSIZIONI

TERRENO IN POLVERE - FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

CHROMOGENIC YERSINIA AGAR BASE

Triptosio	10,0 g
Triptofano	0,10 g
Peptocomplex	5,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sali Biliari n.3	1,50 g
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	0.10 g
X-β-glucuronide CHX salt	0.06 g
Salmon-β-D-galactoside	0.15 g
Agar	13,0 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 dall'acqua, poiché la maggior parte dei patogeni associati alla trasmissione risiede nelle feci umane e degli animali a sangue caldo. L'esame dei campioni d'acqua per la presenza di *E. coli* e batteri coliformi fornisce un'indicazione di tale inquinamento.

 Chromogenic Coliform Agar è riportato nella revisione dei terreni di analisi dell'acqua ISSN:1125-24641 e nella revisione APAT-IRSA2 per il rilevamento e l'enumerazione simultanei di *E. coli* β-glucuronidasi-positivi e batteri coliformi β-D-galattosidasi positivi da campioni d'acqua.

 Peptocomplex e triptosio forniscono azoto, carbonio, amminoacidi 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. I sali biliari n° 3 agiscono come un agente selettivo, inibendo la crescita dei batteri Gram-positivi. Il rilevamento dei batteri coliformi si basa sulla capacità della β-D-galattosidasi di scindere il substrato salmon-β-D-galattoside con la formazione di colonie rosso salmone. L'enumerazione di *E. coli* si basa sul rilevamento di due attività enzimatiche, β-D-glucuronidasi e β-D-galattosidasi, che scindono i substrati cromogeni salmon-β-D-galattoside e X-β-glucuronide, con la formazione di colonie grigio-blu scuro. L'idrolisi di X-GAL è potenziata da IPTG, un induttore dell'operone del lattosio. Il triptofano nel terreno consente di eseguire il test dell'indolo direttamente sulle colonie con l'aggiunta del reagente di Kovacs, per la conferma di *E. coli*.

4A- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sciogliere 37,9 g di terreno in polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione fino al completo scioglimento e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 45-50°C. Mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

4B- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONE

Liquefare il contenuto del flacone in un'autoclave impostata a 100 ± 2°C o in un bagno d'acqua a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un contenitore con acqua, che viene posto su una piastra calda e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima di riscaldare per consentire lo scambio di pressione. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno in piastre Petri sterili, in condizioni asettiche.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto del terreno in polvere:

fine granulometria omogenea di colore beige.

Aspetto del terreno in piastra:

giallo paglierino, limpido o leggermente opalescente

pH del terreno completo a 20-25°C:

6,8 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Type	REF	Pack
Chromogenic Coliform Agar	Terreno disidratato	4012992	500 g (13.2 L)
Chromogenic Coliform Agar	Piastre pronte	491299	3 x 10 piastre, Ø 55 mm
Chromogenic Coliform Agar	Piastre pronte	541299	2 x 10 piastre, Ø 90 mm
Chromogenic Coliform Agar	Flaconi	5112992	6 x 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 da microbiologia, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.





8 - CAMPIONI

Campioni di acqua e altri materiali di importanza sanitaria. Nel raccogliere, conservare, trasportare e preparare i campioni, seguire le regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle norme internazionali applicabili.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Eseguire la conta simultanea di coliformi ed *Escherichia coli*, applicando i normali metodi di laboratorio con inoculazione mediante inclusione, semina in superficie o filtrazione a membrana.

Incubare per 18-24 ore a 37°C.

La revisione APAT-IRSA² dei metodi microbiologici per la determinazione di *E. coli* nell'acqua riporta la seguente procedura:

Filtrare un'aliquota del campione o un volume delle sue diluizioni utilizzando un filtro a membrana solitamente di circa 47 - 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. 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°C ± 1°C per 18-24 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 contare:

- Tutte le colonie rosa-rosse (positive per la reazione β-D-galattosidasi) come presunti batteri coliformi diversi da *E. coli*.
- Tutte le colonie blu-grigio, positive all'indolo (positive per le 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 presuntive devono essere confermate da una reazione ossidasi negativa (strisce per il test ossidasi, REF 191040ST)

Il conteggio dei batteri coliformi totali è la somma di tutte le colonie rosa-rosse ossidasi negative più tutte le colonie blu-grigio.

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	35-37°C/18-24H/A	crescita, colonie grigio-blu
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	34-38°C/18-24H/A	crescita, colonie salmone
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	34-38°C/18-24H/A	inibito

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio per la vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di Chromogenic Coliform Agar disidratato e pronto all'uso vengono testati per produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato e Tryptic Soy Agar (TSA). La produttività viene testata tramite un test quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 ed *E. aerogenes* ATCC 13048; i filtri a membrana sul terreno vengono inoculati con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie ed incubati a 37°C per 24 ore.

Le colonie vengono contate sul Lotto da testare (TB) e su TSA e viene calcolato il rapporto di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{TSA}}$). 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 è testata con tecnica semiquantitativa con *E. coli* ATCC 13762, *C. freundii* ATCC 8090, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *P. vulgaris* ATCC 9484 e *P. aeruginosa* ATCC 10145. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, *E. coli* cresce con colonie grigio-blu, *C. freundii* cresce con colonie salmone, *S. Enteritidis*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa* crescono con colonie incolori. La selettività è valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con diluizioni decimali idonee in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi Gram positivi non target *E. faecalis* ATCC 19433 e *S. aureus* ATCC 25923. La crescita di entrambi i ceppi 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% del sottogenere I di *Salmonella*) possono essere positivi alla β-glucuronidasi; solo eccezionalmente questo test è positivo con i ceppi *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%)³⁻⁵.
- Circa il 3-4% di *E. coli* è negativo alla β-glucuronidasi, in particolare i ceppi *E. coli* O157.6 Di conseguenza, questi ceppi, essendo positivi alla β-galattosidasi, cresceranno con colonie rosso-rosa e saranno contati come coliformi.
- Oltre a esprimere la β-D-glucuronidasi, *E. coli* è in grado di produrre indolo dal triptofano. Pertanto, in caso di dubbi sulle colonie di *E. coli* sul terreno di coltura primario, il test dell'indolo può essere utilizzato come ulteriore conferma.
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre vengono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, provenienti da coltura pura, per un'identificazione completa.

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 qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso 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 buone pratiche di fabbricazione nel processo di produzione dei terreni.
- 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 bagno d'acqua, far bollire per un tempo sufficientemente lungo da sciogliere l'intero terreno.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno. Non mettere i flaconi caldi 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 in watt, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta che il terreno in bottiglia è liquefatto, non può essere solidificato e sciolto una seconda volta.
- Ogni piastra pronta all'uso di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- L'area di laboratorio deve essere controllata per evitare contaminanti come polvere media o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inocolato 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 controllo qualità dei terreni preparati e della convalida della loro conservabilità, in base al tipo (piastre/flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura ed imballaggio).

Piastre pronte all'uso

Conservare le piastre nella loro confezione originale a +2°C/+8°C al riparo dalla luce diretta. Se conservate correttamente, le piastre possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Non utilizzare le piastre oltre questa data. Le piastre provenienti da buste di plastica aperte possono essere utilizzate per 7 giorni se conservate in un'area pulita a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se la busta di plastica è danneggiata o se la piastra è rotta. Non utilizzare le piastre con segni di deterioramento (ad esempio, contaminazione microbica, disidratazione, restringimento o screpolatura del mezzo, colore atipico, eccesso di umidità).

Flaconi pronti all'uso

Conservare i flaconi nella loro confezione originale a +2°C/+8°C al riparo dalla luce diretta. Se conservati correttamente, i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Non utilizzare i flaconi oltre questa data. I flaconi provenienti da confezioni secondarie aperte possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare flaconi con segni di deterioramento (ad esempio, contaminazione microbica, torbidità anomala, precipitato, colore atipico).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. APAT-IRSA Metodi analitici per le acque, vol 3 n° 7000 – Metodi per la determinazione di microrganismi indicatori di inquinamento e di patogeni. n° 7030, 2003, *Escherichia coli*.
2. Bonadonna L. *Escherichia coli* nelle acque significato sanitario e metodologie di analisi. ISSN:1125-2464, 2001
3. Trepeta RW, Edberg SC. Methyumbelliferyl- 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.
6. Robison BJ. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 48:285-288

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	Imballaggio riciclabile
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 6	Modifiche del contenuto del layout	11/2024

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

