

ISTRUZIONI PER L'USO

LEVINE EMB BLUE AGAR

Piastre pronte all'uso

 Levine EMB Agar: colonie di *E.coli* con riflessi metallici e di *S.Typhimurium* (rosate)

1- DESTINAZIONE D'USO

 Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno per l'isolamento e la differenziazione delle *Enterobacteriaceae* da campioni clinici e da altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptone	10,000 g
Lattosio	10,000 g
Potassio fosfato bibasico	3,000 g
Eosina giallastra	0,400 g
Blu di metilene	0,065 g
Agar	14,000 g
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

 Levine EMB Blue Agar è preparato sulla base della formulazione descritta da Levine¹ nel 1918, come modificazione del terreno Holt-Harris & Teague EMB (HHT)² del 1916. Rispetto a quest'ultimo terreno, Levine EMB Blue Agar contiene un unico zucchero, il lattosio, a concentrazione maggiore; secondo l'autore, questa modifica differenzia meglio tra le specie che ora vengono denominate *Escherichia coli* ed *Enterobacter aerogenes*.

 Levine EMB Blue Agar è un terreno versatile, moderatamente selettivo, per l'isolamento e la differenziazione sulla base della fermentazione del lattosio, delle *Enterobacteriaceae* da campioni clinici^{3,4} e da altri materiali. È stato descritto il suo uso per l'esame dei cosmetici,⁵ degli alimenti,⁶ dei prodotti lattiero caseari,⁷ delle acque⁸ e dei prodotti farmaceutici⁹.

 Il peptone fornisce azoto, carbonio, minerali per la crescita microbica; il lattosio è incorporato come carboidrato fermentabile; Il colorante blu di metilene inibisce parzialmente la crescita dei batteri Gram-positivi. L'eosina giallastra è un colorante che risponde ai cambiamenti di pH, passando da incolore a nero in condizioni acide. I batteri Gram-negativi che fermentano il lattosio (generalmente enterici) acidificano il terreno e in condizioni acide i coloranti producono un complesso viola scuro che di solito è associato a riflessi verde-metallico.¹⁰

 La distinzione tra *E.coli* ed *E. aerogenes*, è resa possibile dalla presenza del tampone fosfato che rende minimi gli effetti acidificanti prodotti dalla lenta fermentazione del lattosio da parte di *E. aerogenes*.

4- CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno	verde-violetto, limpido o leggermente opalescente
pH finale a 20-25 °C	7,1 ± 0,2

5 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Levine EMB Blue Agar	Piastre pronte all'uso	541595	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Termostato ed altra strumentazione di laboratorio, anse e tamponi da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

7 - CAMPIONI

 Possono essere utilizzati campioni clinici sui quali ricercare e differenziare le *Enterobacteriaceae*, e campioni di altra origine. Quando possibile, raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antimicrobica ed applicare le buone pratiche di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici. Per i campioni non clinici fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie dell'agar.

Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

 Su Levine EMB Blue Agar le colonie di *E. coli*, di diametro attorno ai 2-3 mm, sono leggermente rialzate, concave, raramente convesse, di colore viola-ciclamino con centro più scuro che si estende per circa 3/4 del diametro della colonia, con riflessi verde metallico,

 Le colonie di *E.aerogenes* sono convesse con un diametro di circa 4-6 mm, di colore da rosa a lavanda con un centro scuro più piccolo di quello che si osserva in *E.coli*; esse sono prive, di norma, di riflessi verde metallico.




Le colonie dei microrganismi lattosio non fermentanti (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* ecc.) sono trasparenti, di color ambra o rosa o incolori.

10 - 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.¹¹

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E.coli</i> ATCC 25922	37°C / 24H / A	crescita, viola-ciclaminio con centro più scuro, con riflessi metallici
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	37°C / 24H / A	crescita, colonie da incolori ad ambra
<i>E.faecalis</i> ATCC 19433	37°C / 24 H / A	crescita parzialmente inibita

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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Levine EMB Blue Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Levine EMB Blue Agar REF 401595) vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target Gram-negativi: *E.coli* ATCC 25922, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *C.freundii* ATCC 8090, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.flexneri* ATCC 12022, *P.vulgaris* ATCC 9484, *P.mirabilis* ATCC 10005. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h ore in aerobiosi si osservano le caratteristiche cromatiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano colori tipici e buone crescite.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate, con metodo Miles Misra modificato, appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non-target Gram-positivi: *E.faecalis* ATCC 29212, *E.faecalis* ATCC 19433 e *S.aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi la crescita dei ceppi non target risulta parzialmente inibita, con presenza di piccole colonie incolori.

12 - LIMITI DEL METODO

- Il terreno qui descritto è moderatamente selettivo: alcuni stafilococchi, streptococchi, enterococchi e lieviti possono crescere con colonie di dimensioni modeste. Anche i bacilli Gram-negativi non fermentanti, come *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* crescono su questo terreno con colonie dalle caratteristiche dei batteri lattosio non fermentanti.³
- Alcuni ceppi di *Salmonella* e *Shigella* non crescono sul terreno.³
- Conservare le piastre in frigorifero ed al buio poiché il colorante fotosensibile può inibire la crescita di certi batteri, soprattutto del genere *Proteus*.¹²
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- 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 prodotti 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- 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.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

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).



**15 - BIBLIOGRAFIA**

1. Levine M. Differentiation of B coli and B aerogenes on a simplified eosin-methylene blue agar J Inf Dis 1918; 23:43-47
2. Holt-Harris JE, Teague O. A new culture medium for the isolation of Bacillus typhosus from stools. J Inf Dis 1916; 18:596-600
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneve: World Health Organization.
5. Curry, Graf and McEwen (ed.). 1993. CTFA microbiology guidelines. The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D.C.
6. U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998.
7. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 13th Ed. APHA, 1972
8. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th Ed APHA, 1975
9. United States Pharmacopoeia XXI (1985) Microbial. Limit Tests. Rockville. Md.
10. Archana Lal, Naowarat Cheeptham. Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol. American Society for Microbiology, 2011
11. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
12. Girolami RL, Stamm JM. Inhibitory effect of light on growth-supporting properties of eosin Methylene Blue Agar. Appl Environ Microbiol 1976;31:141-142

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	02/2021
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 3	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

