

ChromArt

# CHROMOGENIC COLIFORM AGAR ISO FORMULATION

Terreno di coltura in polvere, piastre pronte e flaconi pronti per l'uso



Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation:  
sulla sinistra *E.coli* con colonie blu;  
sulla destra *Citrobacter freundii* con colonie rosse

## 1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo e cromogeno per l'enumerazione contemporanea di *E. coli* e coliformi nelle acque in accordo alla norma ISO 9308-1:2014.

## 2 - COMPOSIZIONE

### FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)\*

Idrolizzato enzimatico di caseina	1,0 g
Estratto di lievito	2,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio fosfato monobasico diidrato	2,2 g
Sodio fosfato bibasico	2,7 g
Sodio piruvato	1,0 g
Sorbitolo	1,0 g
Triptofano	1,0 g
Tergitol 7	0,15 g
Salmon-β-galattoside	0,2 g
X-β-glucuronide	0,1 g
Isopropil-β-D-tiogalactopiranoside (IPTG)	0,1 g
Agar	10,6 g

## 3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation è un terreno selettivo e cromogeno per l'enumerazione contemporanea di *E. coli* e coliformi nelle acque in accordo alla norma ISO 9308-1:2014.<sup>1</sup> A causa delle non elevate proprietà selettive, il terreno è raccomandato per campioni in cui si sospetta una modesta flora contaminante.

Il Tergitol 7 è un agente selettivo con proprietà inibitorie verso i batteri Gram positivi. La differenziazione dei coliformi (diversi da *E. coli*) e di *E. coli* è resa possibile dalla presenza dei substrati cromogenici salmon β-galattoside e X-β-Glucuronide per l'evidenziazione, rispettivamente della β-galattosidasi e della β-glucuronidasi. Il salmon β-galattoside è idrolizzato dai coliformi diversi da *E. coli*, con rilascio di un metabolita color rosa-rosso; tale reazione è potenziata dalla presenza nel terreno di IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranoside). X-β-Glucuronide è idrolizzato, tra gli enterobatteri, da *Escherichia coli* e da pochi altri ceppi di *Salmonella* e *Shigella*; tale idrolisi si traduce nel rilascio di un metabolita di colore blu.

### 4A- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 27,1 g di terreno in 1000 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione. Non autoclavare, non surriscaldare. Raffreddare a circa 45-50°C e distribuire in piastre di Petri per avere uno spessore di almeno 4 mm

Il terreno dopo bollitura può presentarsi opalescente. Tale opalescenza, che non influisce sulle performances microbiologiche, normalmente scompare quando il terreno è raffreddato a 45-50°C per la distribuzione in piastra.

Conservare le piastre al buio a 5 ± 3 °C, protette dall'evaporazione per non più di 1 mese. Non vi deve essere acqua di condensa visibile nelle piastre, in caso contrario le piastre devono essere asciugate per il tempo minimo necessario a rimuovere l'umidità residua.

### 4B- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONE

Scaldare in bagnomaria a 100°C portando ad ebollizione il terreno in flacone, agitando di tanto in tanto. Raffreddare a 47-50°C e trasferire in piastre di Petri sterili.

## 5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea di colore paglierini





Aspetto del terreno in soluzione, in piastra ed in flacone  
pH finale

terreno limpido o leggermente opalescente di colore paglierino  
6,8 ± 0,2

#### 6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation	Terreno in polvere	4012972	500 g (18,6 L)
Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation	Terreno pronto all'uso in piastra	491297	30 piastre, Ø 55 mm
Chromogenic Coliform Agar ISO Formulation	Terreno pronto all'uso in flacone	5112972	6 flaconi 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, membrane ad apparati per la filtrazione del campione, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

#### 8 - CAMPIONI

Il terreno è indicato per l'esame di campioni di acque. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni e gli Standard Interazioni pertinenti.

#### 9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Filtrare 100 mL (o altro volume) di campione con una membrana filtrante (diametro membrana 47-50 mm, diametro pori 0.45 µm). Il minimo volume filtrabile affinché il campione sia correttamente distribuito è di 10 mL. Dopo filtrazione, posizionare sul terreno la membrana assicurandosi che non rimanga aria intrappolata. Incubare a 36 ± 2 °C per 21 ± 3 ore.

#### 10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Dopo incubazione si ottengono colonie con le seguenti caratteristiche:

- *Escherichia coli*: colonie blu o blu-viola
- Coliformi (diversi da *E. coli*): colonie con colore da rosa a rosso

I batteri Gram positivi sono generalmente inibiti. Per evitare falsi positivi da batteri Gram negativi, ossidasi positivi (es. *Aeromonas*), eseguire il test dell'ossidasi (Oxidase Test Strips cat. N° 191040ST).

Eseguire il test dell'ossidasi su tutte le colonie da rosa a rosso (coliformi diversi da *E.coli*) o su almeno 10 colonie. Il test deve risultare negativo.

I coliformi totali sono la somma delle colonie da rosa a rosso ossidasi negative e delle colonie blu o viola blu.

#### 11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità 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.

Controllo produttività: *E. coli* ATCC 25922: crescita, colonie blu; *E.aerogenes* ATCC 13048: crescita, colonie rosa.

Controllo specificità: *P. aeruginosa* ATCC 10145: crescita, colonie incolori

Controllo selettività: *E. faecalis* ATCC 19433: inibito

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

#### 12 - LIMITI DEL METODO

- Alcuni ceppi di *E.coli*, in particolare quelli appartenenti al sierotipo O157:H7, sono per lo più β-glucuronidasi negativi.<sup>4</sup> Di conseguenza, questi ceppi, essendo positivi alla β-galattosidasi, coltiveranno con colonie rosa-rosso e saranno contati come coliformi.
- L'attività della β-glucuronidasi può essere manifestata anche da alcuni altri membri delle *Enterobacteriaceae*, in particolare *Shigella*<sup>5</sup> e *Salmonella*<sup>6</sup>.

#### 13 - 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](http://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 i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- 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.
- Fare attenzione quando si aprono i flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Il terreno pronto in flacone è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.





- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati 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](http://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

**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).

**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. 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.

### 15 - BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* 177: 1750-1753.
3. Kilian M. & Bulow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B.* 1976, 84: 245-251
4. Le Minor, Buissonière J, Novel G, Novel M. Relation entre le sérotype et l'activité β-glucuronidasique chez les *Salmonella*. *Ann Microbiol (Paris)* 1978; 129B (2) :155-165.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

<b>REF</b> Numero di catalogo	o REF	<b>LOT</b> Numero di lotto	<b>IVD</b> Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
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 3	Modifiche del contenuto dei capitoli "Limiti del metodo", "Precauzioni ed avvertenze", "Conservazione e validità", "Bibliografia" e del layout.	07/2021

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

