

ChromArt

CHROMOGENIC COLIFORM AGAR

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


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

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Terreno selettivo e cromogeno per l'enumerazione contemporanea di *E. coli* e coliformi.

2- COMPOSIZIONE

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

Triptosio	10,00 g
Peptocomplex	5,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Triptofano	0,10 g
Sodio cloruro	5,00 g
Sali biliari n° 3	1,50 g
Isopropil-β-D-tiogalattopiranoside (IPTG)	0,10 g
X-β-glucuronide (X-GLUC)	0,06 g
Salmon-β-galactoside (Salmon-GAL)	0,15 g
Agar	13,00 g

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Chromogenic Coliform Agar è un terreno selettivo e differenziale per la determinazione contemporanea di *E. coli* e coliformi nelle acque e negli alimenti. Il terreno è reso selettivo dalla presenza dei sali biliari; la differenziazione dei coliformi e di *E. coli* è resa possibile dalla presenza del substrato cromogenico Salmon-GAL, per l'evidenziazione della β-galattosidasi e del substrato cromogenico X-GLUC per l'evidenziazione della β-glucuronidasi. Il Salmon-Gal è idrolizzato dai coliformi con rilascio di un metabolita color salmone; tale reazione è potenziata dalla presenza nel terreno di IPTG (isopropil-β-D-tiogalattopiranoside). L'X-GLUC 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. Il triptofano contenuto nel terreno, consente di eseguire il test dell'indolo direttamente sulle colonie con l'aggiunta di reattivo di Kovacs', per la conferma di *E. coli*. Il terreno Chromogenic Coliform Agar è riportato nella rassegna dei terreni per l'analisi delle acque ISSN:1125-2464¹ e nella rassegna APAT-IRSA².

4A- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 37,9 g di terreno in 1000 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire e autoclavare a 121°C per 15 minuti.

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 beige
Aspetto del terreno in soluzione, in piastra ed in flacone	terreno limpido di colore paglierino
pH finale	7,0 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Coliform Agar	Terreno in polvere	4012992	500 g (13 L)
Chromogenic Coliform Agar	Terreno pronto all'uso in piastra	497100	30 piastre, Ø 55 mm
Chromogenic Coliform Agar	Terreno pronto all'uso in piastra	541299	20 piastre, Ø 90 mm
Chromogenic Coliform Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5112992	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

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 Interazioni pertinenti.





9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Eeguire la determinazione contemporanea dei coliformi e di *Escherichia coli*, impiegando le normali metodiche di laboratorio con semina per inclusione o in superficie o su membrane filtranti.

Incubare per 18-24 ore a 37°C.

La rassegna dei metodi microbiologi APAT-IRSA² per la determinazione di *E. coli* nelle acque riporta la seguente procedura:

- Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del terreno di coltura e procedere all'incubazione a 36±1°C per 18-24 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

- *Escherichia coli*: colonie grigio blu, indolo positive.
- Coliformi (diversi da *E. coli*): colonie color salmone.
- *Proteus*: colonie con alone marroncino.
- Altri enterobatteri: colonie incolori.

I batteri Gram positivi sono generalmente inibiti. Il test dell'indolo è eseguibile aggiungendo qualche goccia di reattivo di Kovacs' alle colonie ed osservando per la formazione di un colore rosso entro 1-2 minuti.

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 indolo positive

Controllo specificità - *E. aerogenes* ATCC 13048: crescita, colonie salmone, indolo negative

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.³ 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*⁴ e *Salmonella*⁵.

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 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.
- 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. 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.

15 - 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. 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.
4. Kilian M. & Bulow P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B. 1976, 84: 245–251
5. Le Minor, Buisnière 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

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD 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 5	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.

