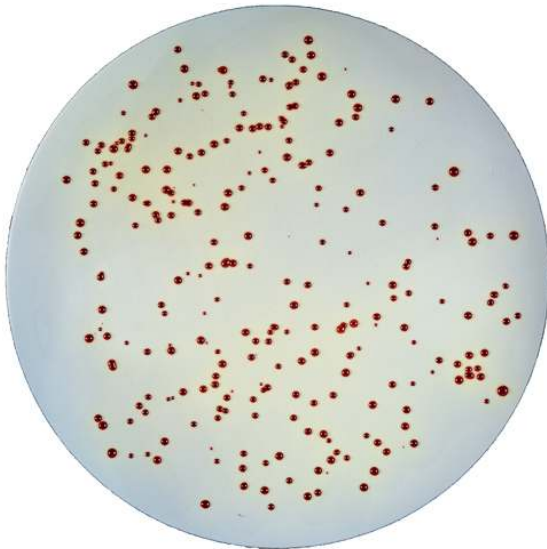




AZIDE MALTOSE AGAR KF TTC 1% SOLUTION

Terreno in polvere, supplemento e piastre pronte all'uso



Azide Maltose Agar KF: colonie di *Enterococcus faecalis*
su membrana filtrante

DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base, supplemento differenziale e piastre pronte all'uso per la determinazione ed il conteggio degli streptococchi fecali nelle acque e negli alimenti.

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

AZIDE MALTOSE AGAR KF

Proteose Peptone	10 g
Estratto di lievito	10 g
Sodio cloruro	5 g
Sodio glicerofosfato	10 g
Maltosio	20 g
Lattosio	1 g
Agar	15 g
Sodio azide	400 mg
Bromocresolo porpora	15 mg

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

CONTENUTO DEL FLACONE

TTC 1% SOLUTION

Trifeniltetrazolio cloruro	0,3 g
Acqua purificata	30 ml

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Azide Maltose Agar KF, addizionato di TTC è preparato secondo la formula sviluppata da Kenner, Clark e Kabler (Kenner-Faecal KF Medium), per l'isolamento selettivo degli streptococchi fecali dalle acque superficiali con metodo della semina diretta o delle membrane filtranti.

Il terreno è raccomandato dagli Standard Methods per l'isolamento ed il conteggio degli streptococchi fecali nelle acque e negli alimenti con la tecnica delle membrane filtranti o per inclusione.

Il gruppo degli streptococchi fecali è stato considerato per lungo tempo un efficace indicatore di contaminazione fecale per gli ecosistemi acquatici. Sebbene alcuni autori considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali, *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo è stato oggetto di numerose definizioni.

Con il termine Streptococchi fecali è stato indicato un gruppo di microrganismi eterogeneo sia dal punto di vista tassonomico sia ecologico, raggruppati insieme sulla base della morfologia microscopica, della reattività alla colorazione di Gram e della assenza dell'enzima catalasi.

Gli studi degli anni 80 (Schleifer e Kilpper-Bälz) hanno suddiviso il genere *Streptococcus*, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridazione del DNA, in tre generi geneticamente diversi (*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*), di cui i primi due comprendono specie intestinali o di origine fecale.

Il genere *Enterococcus* include gli streptococchi di gruppo D di Lancefield che condividono determinate proprietà biochimiche e hanno un'ampia gamma di tolleranze a condizioni avverse (capacità di crescere in cloruro di sodio al 6,5%, pH 9,6 e 45 °C); queste caratteristiche fenotipiche sono comunque ascrivibili alla maggioranza ma non a tutte le specie. La tassonomia del genere è in continua evoluzione: il genere, sulla base dell'analisi delle sequenze di rRNA 16S, comprende, a tutt'oggi, 58 specie e 2 sottospecie (Euzéby, J.P.).

Gli enterococchi possono essere trovati nel suolo, nell'acqua, nei latticini, negli alimenti e nelle piante ed includono specie di dimostrata provenienza intestinale (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans/hirae*, *E. cecorum*) altre di cui l'origine esclusivamente intestinale non è stata completamente provata (*E. raffinosus*, *E. dispar*, *E. flavescens*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. sulphureus*).

All'interno del genere *Streptococcus*, solo *S. bovis* e *S. equinus* sono considerati veri streptococchi fecali. Queste due specie di streptococco si trovano principalmente negli animali.

La denominazione Streptococchi di gruppo D, per indicare gli streptococchi fecali, non è da considerare attendibile in quanto l'antigene del gruppo D di Lancefield è prodotto da *Enterococcus*, da *Pediococcus* e da alcuni streptococchi.

Come conseguenza di questa complessità tassonomica e dei molteplici habitat degli enterococchi, maggiore attenzione dovrebbe essere prestata alla loro identificazione a livello di specie per discriminare quelle veramente intestinali di origine animale, umana ed a sangue caldo ed al loro ruolo come indicatori dell'inquinamento fecale, per la valutazione della qualità igienica delle acque e degli alimenti.



Il Proteose Peptone e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio vitamine, aminoacidi ed elementi in tracce per la crescita microbica; il lattosio ed il maltosio sono carboidrati fermentabili: la produzione di acidi induce il viraggio dell'indicatore di pH bomocresolo porpora verso il giallo; il sodio cloruro contribuisce al bilanciamento osmotico del terreno; la sodio azide è un agente selettivo attivo sulla inibizione della crescita dei batteri Gram negativi; il trifeniltetrazolio cloruro addizionato al terreno di base è ridotto, durante la crescita batterica, a formazano, un pigmento insolubile che colora di rosa-rosso le colonie.

Le piastre pronte all'uso sono a formulazione completa, contenente TTC 0,1g/L

PREPARAZIONE

Sospendere 71,4 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, e bollire per cinque minuti. Non autoclavare. Raffreddare in bagnomaria a 47-50°C ed aggiungere, con le cautele dell'asepsi, 10 ml di TTC 1% Solution, cat. n. 42111801.

CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	terreno limpido di colore rosa
pH (20-25°C)	7,2 ± 0,2

CARATTERISTICHE DEL SUPPLEMENTO TTC 1% SOLUTION

Aspetto della soluzione	limpida, incolore
-------------------------	-------------------

MATERIALI FORNITI

Terreno di base in polvere Azide Maltose Agar KF, supplemento TTC 1% Solution

MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, membrane filtranti, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni di acqua ed alimenti fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

PROCEDURA DELL'ANALISI

Metodo d'impiego con membrane filtranti per l'esame delle acque

- Distribuire 4-5 ml di terreno in piastre di diametro 60 mm.
- Filtrare su membrana un volume appropriato di acqua in funzione della carica attesa ed in modo tale da avere una conta batterica di 20-200 colonie,
- Incubare a 35°C per 48 ore.

Metodo d'impiego per alimenti con il conteggio in piastra con semina per inclusione

- Inserire 1 ml delle diluizioni decimali del campione in piastre di diametro 90 mm, in duplicato;
- Aggiungere a ciascuna piastra circa 20 ml di terreno raffreddato a 47-50°C e miscelare con cura l'inoculo con l'agar
- Incubare a 35°C per 48 ore.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie, se necessario facendo uso di uno stereomicroscopio 15x.

Contare e registrare come streptococchi fecali le colonie da rosa a rosse.

Per una completa identificazione a livello di specie, le piastre con crescite caratteristiche devono essere sottoposte a prove con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' comunque responsabilità 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>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°X 48 H-A	Crescita con colonie rosa-ciclaminio
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	37°X 48 H-A	Crescita con colonie rosa-ciclaminio
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	37°X 48 H-A	Crescita inibita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°X 48 H-A	Crescita inibita

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

LIMITI DEL METODO



- Molti ceppi di *S. bovis* e di *S. equinus* sono inibiti dalla sodio azide.
- Un eccessivo riscaldamento del terreno può indurre un abbassamento del pH ed una diminuita produttività del terreno.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Prima dell'uso consultare le Schede di Sicurezza dei prodotti qui descritti. I terreni in polvere devono essere manipolati con una adeguata protezione delle vie respiratorie.
- 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 questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto qui descritto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare). Scaricare da sito web www.biolifeitaliana.it il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono destinati ai controlli microbiologici dei campioni di acque e di alimenti, 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.
- Il supplemento TTC 1% Solution è soggetto a sterilizzazione terminale per filtrazione ma, non essendo sottoposto a test di sterilità con metodo normato, non è etichettato come "sterile" e deve essere quindi inteso come prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite.
- Smaltire il terreno ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici 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 sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.

CONSERVAZIONE

Terreno in polvere: conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dall'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).

Supplemento e piastre pronte all'uso: conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2-8 °C. Non utilizzare se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: danneggiamento della confezione, contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato)

BIBLIOGRAFIA

- APAT-CNR-IRSA: Metodi per la determinazione di microrganismi indicatori d'inquinamento e di patogeni. 7040. Streptococchi fecali ed enterococchi.
- APHA (1985). Standard Methods for Examinations of Water and Waste-water, 16 th edition
- APHA (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.,
- Charles P. Gerba, in Environmental Microbiology (Third Edition), 2015
- Hardie, D. J.M., Whiley R.A. (1997) Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus RealiJ. App. Microbiol. Symposium Supplement, 83, 1S-11S
- <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/streptococcus>
- Kenner, B.A., Clark, H.F. & Kabler, P.W. (1961). App. Microbiol., 9,15.
- Euzéby, J.P. (2019) LPSN: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. a Folder Available on the Internet
- MacFaddin, Jean F. (1985). Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Pinto, B., Pierotti, R. Canale, G. (1999). Lett. in App. Microbiol. 29, 258-263

CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Azide Maltose Agar KF*	Terreno in polvere	4011072	500 g (7 L)
TTC 1% Solution **	Supplemento liquido	42111801	30 mL
Azide Maltose Agar KF***	Piastre pronte all'uso	541107	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

*CODICE CND W0104010104 ; **CODICE CND W0104010104; *** CODICE CND W0104010405;



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.