

ISTRUZIONI PER L'USO

LEVINE EMB BLUE AGAR

Terreno in polvere


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

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

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

* 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 Levine nel 1918¹, come modificazione del terreno Holt-Harris & Teague EMB (HHT) del 1916². Rispetto a quest'ultimo terreno, il Levine EMB 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 delle *Enterobacteriaceae* sulla base della fermentazione del lattosio, da campioni clinici e da altri materiali. È stato descritto il suo uso per l'esame dei cosmetici³, degli alimenti⁴, dei prodotti lattiero caseari⁵, delle acque⁶ e dei prodotti farmaceutici⁷. Levine EMB Blue Agar può essere usato anche per l'isolamento di *Candida* spp. da materiale di origine clinica, aggiungendo al terreno clortetraciclina HCl 0,1 g/L.⁸

 Il peptone fornisce azoto, carbonio, minerali per la crescita microbica; il lattosio è incluso come carboidrato fermentabile; l'eosina ed il blu di metilene hanno una lieve attività inibitoria verso i microrganismi Gram-positivi; il rapporto ottimale fra contenuto dei due coloranti permette la differenziazione degli enterobatteri lattosio-fermentanti da quelli lattosio non fermentanti. 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 - PREPARAZIONE

Sospendere 37,5 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 60°C e, prima di trasferirlo in piastra, agitare delicatamente il matraccio per ossidare il blu di metilene e per disperdere il precipitato a fiocchi che si forma durante la sterilizzazione e che è una componente essenziale del terreno.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, viola
Aspetto del terreno in soluzione	verde-viola con fiocchi, opalescente
Aspetto del terreno in piastra	verde-viola, limpido o leggermente opalescente
pH (20-25°C)	7,1 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Levine EMB Blue Agar CND: W0104010101; EDMA:14.01.01.01	Terreno di coltura in polvere	4015952	500 g (13.3L) RDM: 1873813/R
		4015954	5 kg (133 L) RDM: 1873822/R

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

 Possono essere utilizzati campioni clinici sui quali ricercare e differenziare le *Enterobacteriaceae* e campioni di altra origine. Per i campioni alimentari, farmaceutici e cosmetici e per le acque fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili. Seguire le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

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

Campioni clinici: 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 ed osservare dopo 18-24 ore.

Per l'isolamento di *Candida* spp. con il terreno addizionato di clorotetraciclina, incubare a 35-37°C per 24-48 ore in atmosfera al 10% di CO₂.

Campioni non clinici: consultare le norme e gli Standards applicabili per i dettagli delle procedure operative.

10 - 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.

Le colonie di *C. albicans* appaiono a ragnatela o piumose, le altre candidi coltivano con colonie piccole, tipiche dei lieviti.

11 - CONTROLLO QUALITÀ

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 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C / 24 H / A	crescita, viola-ciclamino con centro più scuro, con riflessi metallici
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	37°C / 24 H / A	crescita, colonie rosa scuro
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	37°C / 24 H / A	crescita, colonie incolori/biancastre
<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

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Levine EMB Blue Agar sono 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 8 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 8484, *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, comparabili con il Lotto di Riferimento. Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁶ di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non-target Gram positivi: *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433. 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.

13 - 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.⁹
- Alcuni ceppi di *Salmonella* e *Shigella* non crescono sul terreno.⁹
- Conservare le piastre in frigorifero ed al buio poiché il colorante fotosensibile può inibire la crescita di certi batteri, soprattutto del genere *Proteus*.¹⁰
- 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 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno 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.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura 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 questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza 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 i campioni come potenzialmente infettivi.
- Sterilizzare tutti i rifiuti biologici. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o 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. Questo vale anche in relazione a eventuali diritti di terzi. 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

Conservare a +10°C /+30°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).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Holt-Harris JE, Teague O. A new culture medium for the isolation of Bacillus typhosus from stools. J Inf Dis 1916; 18:596-600
- Levine M. Differentiation of B coli and B aerogenes on a simplified eosin-methylene blue agar J Inf Dis 1918; 23:43-47
- Curry, Graf and McEwen (ed.). 1993. CTFA microbiology guidelines. The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D.C.
- U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998.
- Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 13th Ed. APHA, 1972
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th Ed APHA, 1975
- United States Pharmacopoeia XXI (1985) Microbial. Limit Tests. Rockville. Md.
- Weld JT. Candida albicans: Rapid identification in pure culture with carbon dioxide on Modified Eosine Methylene Blue medium. Arch Dermat Syph 1952; 66: 691-694
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- Girolami RL Stamm JM (1976) 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	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020

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

