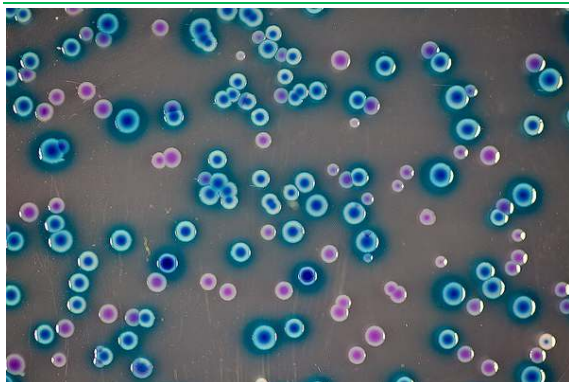


**ChromArt****CHROMOGENIC E.COLI O157 AGAR**

Terreno di coltura in polvere



Chromogenic E.coli O 157 Agar: colonie di *E.coli* O157 con centro viola intenso e di *E.coli* non O157 (colonie blu)

**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Terreno selettivo e cromogeno per l'isolamento e la differenziazione di *E. coli* O157:H7 dagli alimenti.

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

Peptoni	17,0 g
Sali biliari n.3	1,5 g
Miscela di cromogeni	0,5 g
Agar	12,0 g

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

**3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

I ceppi enteroemorragici di *E. coli* (EHEC) produttori di verocitotossina/shigatossina (VTEC o STEC) hanno assunto un particolare significato clinico a partire dai primi episodi di tossinfezioni alimentari da loro sostenuti, segnalati negli anni 80.<sup>1</sup> Pur essendo noti più di 300 sierotipi VTEC, l'infezione è causata soprattutto dal sierotipo mobile *E. coli* O157:H7 e dalla sua variante immobile O157:NM (O157:H-).<sup>2</sup> La severità della patologia, che presenta quadri variabili da una diarrea non complicata ad una colite emorragica, fino alla sindrome emolitico-uremica ed alla porpora trombotica trombocitopenica, unitamente alla bassa dose infettante (10-100 cellule), rendono i ceppi VTEC/STEC particolarmente temibili, soprattutto per i soggetti più vulnerabili, quali i bambini e gli anziani.<sup>3</sup> La virulenza dei ceppi è sostanzialmente dovuta alla produzione di una o di entrambi le shigatossine *Stx1* e *Stx2* e, più raramente, da loro varianti.<sup>2</sup> Le fonti dell'infezione sono state individuate nella carne cruda, nei prodotti a base di carne, succhi di frutta non pastorizzati, acqua, latte, germogli e verdura.<sup>4</sup> Anche il contatto diretto con animali appartenenti alle specie serbatoio e la trasmissione persona-persona, per via oro-fecale, possono giocare un ruolo nella propagazione dell'infezione.<sup>5</sup>

*E. coli* O157:H7 è fenotipicamente distinguibile da *E. coli* non O157 per l'incapacità di fermentare il sorbitolo o di fermentarlo oltre le 24 ore di incubazione e per l'assenza dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi<sup>6</sup>; sulla base di queste caratteristiche sono stati sviluppati diversi terreni colturali classici, come CT-SMAC e CT-SMAC MUG. A seguito delle osservazioni sull'isolamento di ceppi STEC di *E. coli* O157 sorbitolo positivi, ceppi  $\beta$ -glucuronidasi positivi e ceppi che non coltivano su CT-SMAC<sup>7,8,9</sup>, sono stati proposti diversi terreni cromogeni basati su meccanismi differenziali più specifici.

Chromogenic *E. coli* O157 Agar impiega una miscela di composti cromogeni per l'evidenziazione di attività enzimatiche proprie delle *Enterobacteriaceae* ( $\beta$ -glucuronidasi e  $\beta$ -glucosidasi) e di una attività enzimatica specifica di *E. coli* O157; l'azione selettiva è dovuta alla presenza dei sali biliari n. 3 che inibiscono la crescita dei batteri Gram positivi.

Per incrementarne la selettività e quindi la specificità dei risultati, al terreno può essere aggiunto potassio tellurito e cefixime: secondo i dati di Zadik<sup>10</sup> tale aggiunta inibisce completamente o parzialmente la crescita del 67% di *E. coli* non O157 e quasi completamente la crescita di altri Gram negativi non fermentanti il sorbitolo.

**4 - METODO DI PREPARAZIONE**

Sospendere 31 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 44-47°C e distribuire in piastre di Petri sterili. Se necessario, per campioni particolarmente contaminati, aggiungere al terreno raffreddato a 47-50°C, il contenuto di una fiala di Cefixime Tellurite O157 Supplement, (REF 42ISEC), ricostituito con 5 ml di acqua purificata sterile.

**5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

limpido di colore paglierino

pH (20-25°C)

7,2  $\pm$  0,2**6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic <i>E. coli</i> O157 Agar	Terreno di coltura in polvere	4055812	500 g (16,1 L)
		4055811	100 g (1,6 L)

**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. Cefixime Tellurite O157 Supplement, REF 42ISEC.

**8 - CAMPIONI**

Campioni alimentari: fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.<sup>2-11</sup>





### 9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

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

- Preparare la sospensione madre del campione diluendone una aliquota *m* con un volume pari a *9m* di Modified Tryptic Soy Broth (REF 402155M2) addizionato di novobiocina 20 mg/L (Novobiocin Antimicrobial Supplement - REF 4240045).
- Incubare la sospensione a 41,5±1°C per 6 ore. Proseguire l'arricchimento per ulteriori 12-18 ore a 41,5±1°C.
- Eseguire sulle colture arricchite, la fase di separazione e concentrazione immunomagnetica con sfere rivestite di anticorpi anti *E.coli* O157, dopo 6 ore e, di nuovo, se necessario, dopo 12-18 ore.
- Seminare 2 aliquote da 50 microlitri del materiale ottenuto nella fase di separazione immunomagnetica, rispettivamente su una piastra di Chromogenic *E.coli* O157 Agar e su una piastra di Mac Cokey Sorbitol Agar + cefixime e potassio tellurito (CT-SMAC). Strisciare l'inoculo sulla superficie dei due terreni in modo da ottenere lo sviluppo di colonie ben isolate.
- Incubare Chromogenic *E.coli* O157 Agar per 18-24 ore a 35-37°C in aerobiosi. Incubare le piastre di CT-SMAC secondo le istruzioni specifiche del terreno

### 10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le colonie da rosa a viola possono essere presuntivamente identificate come *E.coli* O157:H7.

I ceppi di *E.coli* non appartenenti al sierogruppo O157, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* coltivano con colonie blu o verde.

Purificare le colonie tipiche con trapianto su Nutrient Agar con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore.

Eseguire i test di conferma biochimici per *E.coli* e sierologici con gli antisieri specifici O157 ed H7.

La norma ISO16654<sup>11</sup> richiede l'esecuzione preliminare del test dell'indolo (+) e la prova con antisiero O157. FDA BAM<sup>2</sup> indica l'esecuzione del test della β-galattosidasi (+), della β-glucuronidasi (-) e dell'indolo (+) e le prove con antisieri O157 e H7.

La colonia da rosa a viola, con il profilo biochimico di *E.coli* e positiva agli antisieri O157 ed H7 è confermata come *E.coli* O157:H7.

Se la colonia risulta O157 (+) ma H7 (-), essa può appartenere ad una variante immobile (O157:NM) e quindi richiede un test di conferma del suo potenziale tossigenico (ad esempio con tecnica PCR). La colonia può anche essere seminata su piastra di agar sangue per indurre la mobilità e ri-testata con antisiero H7. I ceppi O157:H7 ed i ceppi O157:NM che producono verocitotossina sono considerati patogeni. Tuttavia i ceppi O157:NM che non producono verocitotossina o altri fattori di virulenza non sono probabilmente patogeni. Vi sono molti ceppi di *E.coli* O157 con fattore H diverso da H7 (H3, H12, H16, H38, H45 ecc.) e tali ceppi spesso non producono nessun fattore di virulenza enteromorragica.<sup>2</sup> Per una esposizione completa dei criteri e dei metodi di identificazione si rimanda alla letteratura citata per i campioni clinici<sup>12</sup> e per i campioni alimentari<sup>2</sup>.

### 11 - 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 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>Escherichia coli</i> O 157 ATCC 43888	37°C / 24 H / A	crescita, colonie viola
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37°C / 24 H / A	crescita, colonie blu
<i>E.faecalis</i> ATCC 19433	37°C / 24 H / A	crescita inibita

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

### 12 - LIMITI DEL METODO

- Chromogenic *E.coli* O157 Agar non determina stipti EHEC di *E. coli* diversi da O157:H7.
- Attenersi ai tempi ed alle temperature consigliate poiché *E. coli* O157 non coltiva a 44-45°C e poiché l'osservazione ritardata delle colonie può indurre ad errori di interpretazione.
- Salmonella* spp., soprattutto in assenza del supplemento Cefixime Tellurite, possono sviluppare colonie con un lieve centro viola, tali da non essere distinguibili da *E.coli* O157.
- Alcuni enterococchi possono sviluppare piccole colonie con incubazione prolungate oltre le 24 ore.
- 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.

### 13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è destinato ai controlli microbiologici, è 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 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 o agenti microbici.
- 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.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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**

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).

**15 - BIBLIOGRAFIA**

- Centers for Disease Control. 1984. Update: sporadic hemorrhagic colitis. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 33:28
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4a Diarrheagenic *Escherichia coli*. Rev October 2018
- Griffin, P. M., S. M. Ostroff, R. V. Tauxe, K. D. Greene, J. G. Wells, J. H. Lewis, and P. A. Blake. 1988. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 109:705-712.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:603-609.
- Johnson RP, Wilson JB, Michel P, Rahn K, Renwick SA, Gyles CL, Spika JS. Human infection with verotoxigenic *Escherichia coli* associated with exposure to farms and rural environments. In: Stewart CS, Flints HJ, editors. *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. CABI Publishing; Wallingford, U.K: 1999. pp. 147-168.
- Thompson JS, Hodge DS, Borczyk AA. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2165-2168.
- Díaz S, Vidal D, Herrera-León S, Sánchez S. Sorbitol-fermenting,  $\beta$ -Glucuronidase-positive, shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging red deer in south-central Spain. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 8:1313-1315
- CDR Weekly. CDR. Sorbitol-fermenting Vero cytotoxin-producing *E. coli* (VTEC O157). CDR. 2006
- Gunzer F, Bohm H, Russmann H et al. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic Ssyndrome. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1807.
- Zadik PM, Chapman PA, and Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol* 1993; 39:155-158
- ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of *E.coli* O157

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 6	Eliminazione marcature CE	08/2020

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

