

**ChromArt**

CHROMOGENIC CRONOBACTER ISOLATION (CCI) AGAR

Terreno in polvere, piastre pronte all'uso.

Chromogenic Cronobacter Isolation Agar - colonie blu: *Cronobacter sakazakii*; colonie bianche con centro grigio: *Salmonella* Enteritidis.

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno cromogeno per la determinazione (presenza o assenza) di *Cronobacter* spp. nei campioni della filiera alimentare.

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

Triptone	7,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranoside	0,15 g
Sodium desossicolato	0,25 g
Ferro III ammonio citrato	1,00 g
Sodio tiosolfato	1,00 g
Agar	14,50 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Cronobacter sakazakii è un bastoncino Gram negativo, classificato in passato come variante pigmentata di giallo di *Enterobacter cloacae*. È un patogeno coinvolto in meningiti, sepsi ed enterocoliti necrotizzanti in neonati immaturi o immunocompromessi con elevati tassi di mortalità. È altresì responsabile di infezioni nosocomiali.¹

Le patologie sono state associate al consumo di preparati per neonati in polvere a base di latte o di soia, contaminati da *Cronobacter*.^{2,3} Episodi di infezioni sono stati segnalati nelle unità di terapia intensiva neonatale in Canada, USA, UK, Grecia, Olanda.

Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar è un terreno per la determinazione (presenza o assenza) di *Cronobacter* spp. nei campioni di alimenti ed ingredienti destinati al consumo umano o animale e nei campioni ambientali delle aree di produzione e trattamento degli alimenti in accordo a ISO 22964:2017.⁴

Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar è un terreno selettivo per Gram negativi contenente un composto cromogeno per la differenziazione di *Cronobacter* che coltiva con colonie blu. La presenza nel terreno del sistema indicatore sodio tiosolfato/ferro ammonio citrato consente di differenziare i batteri tiosolfato reductasi positivi (es. *Proteus*, *Salmonella*) che coltivano con colonie con lieve centro nero.

4 - PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 31,9 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione e bollire fino a scioglimento completo. Sterilizzare in autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare tra 47° C e 50 °C e distribuire 18- 20 ml in piastre sterili.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto del terreno disidratato:	polvere fine di colore grigiastro
Aspetto del terreno in piastra:	ambra limpido.
pH finale del terreno a 25 °C:	7,3 \pm 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar CND:W0104010101	Terreno in polvere	4080301	100 g (3.1 L)
		4080302	500 g (15.7 L)
Chromogenic Cronobacter Isolation (CCI) Agar CND:W0104010402;	Piastre pronte all'uso	548030	2 x 10 piastre \varnothing 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane; confezionamento secondario: scatola di cartone

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, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Campioni di alimenti ed ingredienti destinati al consumo umano o animale e campioni ambientali delle aree di produzione e trattamento degli alimenti in accordo a ISO 22964:2017. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio e fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.





9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Aggiungere 10 g o 10 ml di campione a 90 ml di Buffered Peptone Water (Casein) (REF 401278C). Per inoculi superiori ai 10 g preriscaldare il brodo a 34-38°C.

Incubare il brodo di pre-arricchimento a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18 ore \pm 2 ore.

Trasferire 0,1 ml di brodo di pre-arricchimento incubato come al punto precedente in 10 ml di Cronobacter Screening Broth (REF 401355).

Incubare le provette di brodo d'arricchimento a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore \pm 2 ore

Inoculare con un'ansata di brodo d'arricchimento (circa 10 mcl) una piastra di CCI Agar ed incubare capovolta a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore \pm 2 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Colonie tipiche di *Cronobacter* da 1 a 3 mm di colore blu o verde blu.

Colonie di batteri Gram negativi non tipiche possono sviluppare sul CCI Agar con le seguenti caratteristiche: bianche, con o senza centro grigio o nero o verde.

Eseguire sulle colonie tipiche i test di conferma come riportato sulla norma ISO 22964.⁴

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	SPECIFICHE
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	$41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 24 h \pm 2 h.	Crescita, colonie verde-blu
<i>C. muytjensis</i> ATCC 51329	$41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 24 h \pm 2 h.	Crescita, colonie verde-blu
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	$41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 24 h \pm 2 h.	Colonie bianche
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 24 h \pm 2 h.	Inibito

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

12- LIMITI DEL METODO

- Cronobacter* può essere presente in bassi numeri nei campioni, accompagnati da altri Enterobatteri, come *E. cloacae*, che possono interferire nella determinazione del microrganismo target.
- L'impiego di campioni di grandi dimensioni può compromettere la determinazione di *Cronobacter* stressati, quando vi sia la presenza concomitante di microflora non target (es. probioti).

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 in piastra qui descritti contengono 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.
- 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 $+2^\circ\text{C} / +8^\circ\text{C}$ 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 $2-8^\circ\text{C}$ 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 $2-8^\circ\text{C}$. 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).



15 - BIBLIOGRAFIA

1. Carol Iversen et al., The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies BMC Evol Biol. 2007; 7: 64.
2. Simmons BP et al. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 1989; 10: 398.
3. Van Acker J et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *E.sakazakii* in powdered milk formula. J.Clin.Microbiol. 2001; 39:293-297.
4. ISO/TS 22694:2006 Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*
5. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	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 3	Modifiche del contenuto dei capitoli "Precauzioni ed avvertenze", "Conservazione e validità" e del layout.	07/2021

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

