



ETHYL VIOLET AZIDE (EVA) BROTH - LITSKY

Terreno di coltura in polvere e in provette pronte all'uso



EVA Broth-Litsky. Da sinistra provetta non inoculata, *E. faecalis*

DESTINAZIONE D'USO

Terreno per la prova di conferma degli enterococchi.

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

Triptosio	20,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Glucosio	5,0 g
Potassio fosfato bibasico	2,7 g
Potassio fosfato monobasico	2,7 g
Sodio azide	0,4 g
Violetto etile	0,83 mg

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

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Ethyl Violet Azide (EVA) Broth è un terreno liquido sviluppato da Litsky, Mallmann e Fifield nel 1953 e dagli stessi autori modificato due anni dopo riducendo la concentrazione del glucosio ed aumentando quella del violetto di etile.

Larkin et al. hanno usato Azide Dextrose Broth come test presuntivo ed EVA Broth per il test di conferma degli streptococchi, in alimenti congelati.

APHA, WHO, USEPA riportano la prova di conferma Ethyl Violet Azide Broth dopo l'esecuzione del test presuntivo MPN con Azide Dextrose Broth.

Le linee guida APAT, IRSA-CNR per la ricerca degli streptococchi fecali/enterococchi nelle acque con metodo MPN, indicano l'uso di Azide Dextrose Broth seguito da test di conferma in Ethyl Violet Azide Broth.

Il triptosio fornisce azoto, carbonio, aminoacidi ed elementi in tracce per la crescita microbica; l'azide sodica limita la crescita dei batteri Gram negativi attraverso il blocco dell'enzima citocromo ossidasi; il violetto d'etile limita la crescita dei pochi ceppi di bacilli sporulanti e cocchi Gram-positivi diversi dagli enterococchi che generano falsi positivi in Azide Dextrose Broth; il glucosio è un carboidrato fermentabile; il sodio cloruro contribuisce al mantenimento dell'equilibrio osmotico del terreno; i fosfati di potassio agiscono da sistema tampone del terreno.

Per una più completa descrizione delle caratteristiche del gruppo streptococchi fecali/enterococchi intestinali si rimanda alla scheda tecnica del terreno Azide Maltose Agar KF (401107)

PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 35,8 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Scaldare fino a completo scioglimento del terreno, distribuire in provette ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Si raccomanda di non eccedere nel tempo di sterilizzazione.

CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea grigiastrea
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	ambra, limpido.
pH (20-25°C)	7,0 ± 0,2

MATERIALI FORNITI

Terreno di coltura Ethyl Violet Azide (EVA) Broth in polvere o pronto all'uso in provette.

MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

CAMPIONI

Il metodo d'analisi qui riportato, è adatto all'esame delle acque. Riferirsi alla letteratura citata ed ad altre norme o Standards applicabili per i dettagli operativi del campionamento e della preparazione dei campioni.

PROCEDURA DELL'ANALISI

- Agitare vigorosamente il campione di acqua per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi.
- Eseguire il conteggio in tubi, secondo il metodo del numero più probabile (MPN); variare l'entità dell'inoculo (multipli o frazioni di 1 ml) in funzione del tipo di campione, allestendo almeno cinque tubi per ogni diluizione con Azide Dextrose Broth (REF 4011105).



- Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore ed osservare se vi è sviluppo microbico (torbidità del brodo); in caso negativo protrarre l'incubazione per altre 24 ore.
- Prelevare, sterilmente, 1 mL di brodocoltura dai tubi positivi ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il terreno Ethyl Violet Azide Broth per la prova di conferma.
- Incubare i tubi a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 24+24 (± 3) ore. Considerare positivi i tubi che presentano torbidità accompagnata da un deposito grigio-violetto sul fondo della provetta

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare per la formazione di torbidità nella provetta

Considerare positivi i tubi che presentano torbidità accompagnata da un deposito grigio-violetto sul fondo della provetta

L'identificazione completa a livello di specie dei microrganismi coltivati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

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. 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 29212	37°C/48H-A	Buona crescita con deposito violaceo sul fondo
<i>E.coli</i> ATCC 25922	37°C/48H-A	Crescita inibita

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

LIMITI DEL METODO

- Come specificato da APHA il metodo MPN con Azide Dextrose Broth seguito da test di conferma con Ethyl Violet Azide Broth non è applicabile alle acque salate, per le quali si consiglia la tecnica delle membrane filtranti.
- La prova di conferma in Ethyl Violet Azide Broth si rende necessaria poiché in Azide Dextrose Broth crescono alcuni bacilli e cocci Gram positivi diversi dagli enterococchi.
- Per la sub-coltura da Azide Dextrose Broth in Ethyl Violet Azide Broth usare un inoculo pesante poiché quest'ultimo terreno non è idoneo alla crescita degli enterococchi a partire da lievi inoculi.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Prima dell'uso consultare la Scheda di Sicurezza del prodotto. I terreni in polvere devono essere manipolati con una adeguata protezione delle vie respiratorie.
- Il prodotto qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* sugli animali e quelli durante il processo 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 qui descritto è destinato all'esame microbiologico delle acque, 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.
- 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.

CONSERVAZIONE

Terreno in polvere: Conservare a $+10^\circ\text{C}$ / $+30^\circ\text{C}$ 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).

Provette pronte all'uso: Conservare a $2-8^\circ\text{C}$ al buio, fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento. Validità del prodotto dalla data di fabbricazione: 8 mesi.

BIBLIOGRAFIA

- APAT, IRSA-CNR Manuali e Linee Guida 29/2003 Metodi analitici per le acque. Cap 3, 7040
- APHA (American Public Health Association) (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 18th edn, pp. 971-972. Washington, DC: American Public Health Association.
- Larkin, E.P., Litsky, W., Fuller J.E. (1955). Fecal streptococci in frozen foods. I. A bacteriological survey of some commercial frozen foods. Appl. Microbiol., 3:98, 102, 104, 107.



- Litsky, W., Mallmann, W.L. & Fifield, C.V. (1953) - A new medium for the detection of Enterococci in water. Amer. J. Pub. Hlth. 43, 873.
- Litsky, W., Mallmann, W.L. & Fifield, C.V. (1955) – Comparison of the most probable numbers of Escherichia coli and enterococci in rivers water. Amer. J. Pub. Hlth. 45(2), 1049.
- MacFaddin, Jean F. (1985). Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- US EPA (1986) Ambient water quality criteria for bacteria-1986. EPA440/5-84-002. Office of Water Regulations and Standards Division. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 18p.
- WHO (1982) Examination of water for pollution control. Part III: Biological, Bacteriological and Virological Examination., ed. Oxford. Pergamon Press, World Health Organization.

CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Ethyl Violet Azide (EVA) Broth-Litsky Ethyl Violet Azide (EVA) Broth-Litsky	Terreno di coltura in polvere Terreno in provette pronte all'uso	4014852 551485	500 g (14 L) 20 provette, fondo piatto, tappo a vite, con 10 mL di terreno



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