

## AESCULIN BILE AZIDE AGAR

### Terreno di coltura in polvere


 Aesculin Bile Azide Agar: *Enterococcus faecalis*

#### 1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione di enterococchi da cibo, acqua e campioni ambientali.

#### 2 - COMPOSIZIONE

##### FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA\*

Tryptone	17,00 g
Peptone	3,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Oxgall	10,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Sodio citrato	1,00 g
Esculina	1,00 g
Fe-Ammonio Citrato	0,50 g
Sodio azide	0,25 g
Agar	13,00 g

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

#### 3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Aesculin Bile Azide Agar è un terreno selettivo e diagnostico per enterococchi. Rochaix riferì per la prima volta nel 1924<sup>1</sup> sulla validità della reazione di idrolisi dell'esculina per l'identificazione degli enterococchi. Terreni di questo tipo sono stati studiati e proposti fin dal 1950 e alcuni autori ne hanno valutato l'efficacia in campo clinico e igienico.<sup>2</sup>

Aesculin Bile Azide Agar si basa sulla formulazione di Isenberg et al.<sup>3</sup> che, nel 1970, ha modificato la formula di Rochaix riducendo la concentrazione di sali biliari e aggiungendo sodio azide per l'isolamento degli streptococchi di gruppo D e la loro differenziazione da quelli non D. Secondo l'attuale nomenclatura batterica, la designazione di "streptococchi di gruppo D" per gli streptococchi fecali non è da considerarsi specifica poiché l'antigene di gruppo D di Lancefield è prodotto da *Enterococcus*, *Pediococcus* e alcuni streptococchi.<sup>4,5</sup> La differenziazione tra gli enterococchi di gruppo D ed i batteri del gruppo D non enterococchi (entrambi positivi al test dell'esculina) può essere fatta attraverso il test di tolleranza all'NaCl al 6,5%: il primo gruppo è tollerante a questa concentrazione di sale, il secondo ne è inibito.<sup>5,6</sup> Tryptone, peptone ed estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine, aminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica; sodio azide e sali biliari sono agenti selettivi che limitano la crescita di batteri Gram-negativi e Gram-positivi diversi dagli streptococchi; l'esculina viene idrolizzata dagli enterococchi a glucosio ed esculetina (6-7-diidrossicumarina): l'esculetina reagisce con i sali di ferro del terreno conferendogli un colore bruno-nero.

#### 4-PREPARAZIONE

Sospendere 55,7 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Non superare il tempo e la temperatura di sterilizzazione. Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

#### 5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	limpido, scuro con una leggera dominante blu
pH (20-25°C)	7,1 ± 0,2

#### 6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Aesculin Bile Azide Agar	Terreno di coltura in polvere	4010142	500 g (9 L)

#### 7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi, beute autoclavabili, anse e tamponi da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per la completa identificazione delle colonie.

#### 8-CAMPIONI

Fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili per la raccolta di campioni di cibo e acqua. Operare in conformità con le buone pratiche di laboratorio per la raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni al laboratorio.

#### 9-PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare una diluizione di 1:10 con acqua peptonata. Entro 3 ore dalla preparazione del campione, distribuire sulle piastre 0,1 mL di inoculo. Incubare a 35°C o a 42°C per 18-24 ore (la temperatura di incubazione più alta aumenta la selettività del terreno).

#### 10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.





L'aspetto delle colonie di enterococchi su Aesculin Bile Azide Agar dopo 24 ore di incubazione a 37°C è caratteristico: colonie convesse, traslucide o biancastre, di 1-2 mm di diametro con alone marrone scuro o nero; l'incubazione non deve essere prolungata oltre le 24 ore, poiché un esteso annerimento del mezzo rende difficile la lettura.

### 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 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/24 H/ A	buona crescita, colonie con alone nero
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	37°C/24 H/ A	parzialmente inibito
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C/24 H/ A	inibito

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

### 12 - VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti del terreno in polvere Aesculin Bile Azide Agar viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato.

Le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 19434. *E. hirae* ATCC 10541. Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore i ceppi target producono colonie con annerimento del terreno

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non bersaglio: *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. pneumoniae* ATCC 6303, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922. La crescita del ceppo non bersaglio è totalmente inibita dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore

### 13-LIMITI DEL METODO

- La distribuzione non uniforme delle colonie batteriche o la presenza di elevate cariche microbiche possono interferire con la differenziazione delle colonie positive a causa della diffusione del colore nelle colonie adiacenti.
- Altri microrganismi come *Listeria* e *Aerococcus* e occasionalmente ceppi di *S. mutans* e *S. sanguis* possono crescere su Aesculin Bile Azide Agar con annerimento del terreno. Il test dell'idrolisi dell'esculina non può essere utilizzato da solo per identificare gli enterococchi ma deve essere utilizzato in combinazione con altri test: colorazione di Gram, catalasi, crescita in presenza di NaCl 6,5%. I cocci Gram-positivi, esculinasi-positivi e catalasi-negativi che crescono in presenza del 6,5% di NaCl sono enterococchi.<sup>6</sup>
- Ci sono streptococchi che crescono in presenza di sodio azide ma non idrolizzano l'esculina; la presenza di accrescimento in assenza di annerimento non è una caratteristica identificativa degli enterococchi.<sup>6</sup>
- I terreni con esculina, sali biliari e sodio azide sono più adatti per l'isolamento primario degli enterococchi che per la loro differenziazione, per i quali i terreni di coltura senza sodio azide (Bile Esculin Agar) sono migliori.
- Sebbene l'uso previsto e il metodo d'uso del terreno qui descritto si riferisca alla rilevazione di enterococchi negli alimenti e in altri materiali e pertanto il prodotto non debba essere considerato un diagnostico in vitro, la letteratura riporta l'uso di Bile Azide Agar per il rilevamento di *Enterococcus* spp. in campioni clinici. Le applicazioni cliniche devono essere convalidate dall'utente.
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa su isolati, da coltura pura, per una completa identificazione.

### 14-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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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 a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto 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.

### 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, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

### 16-BIBLIOGRAFIA

1. Roचाix, A. Milieux a l'esculine pour le diagnostic differential des bacteries du groups strepto-enteropneumocoque. C R Soc Biol. 1924; 90:771-72.
2. Swan A. The use of a bile-esculin medium and of Moxed's technique of Lancefield grouping in the identification of enterococci (group D streptococci). J Clin Pathol 1954; 7:160-3.
3. Isenberg HFD, Goldberg D, Sampson J. Laboratory studies with a selective Enterococcus medium. Appl Microbiol.1970;20:433-36.
4. Hardie D, J.M., Whiley R.A. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus J App Microbiol Symposium Supplement, 1997,83, 1S-11S
5. <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/streptococcus>
6. MacFaddin, JF. Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1985.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF Numero di lotto	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 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 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	07/2022

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

