



BILE AESCULIN AGAR

Terreno di coltura in polvere



Bile Aesculin Agar: colonie di *Enterococcus faecalis*

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno differenziale per il test di conferma delle colonie di enterococchi isolate dagli alimenti e dalle acque.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Estratto di carne	3,0 g
Peptone	5,0 g
Bile di bue	40,0 g
Ferro citrato	0,5 g
Esculina	1,0 g
Agar	14,0 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nel 1924, Rochaix¹ applicò il test dell'esculina per la differenziazione degli enterococchi dagli altri streptococchi. Utilizzando la base dell'esculina, Meyer e Schonfeld², nel 1926 aggiunsero la bile: nel loro studio scoprirono che gli enterococchi erano in grado di crescere e scindere l'esculina, mentre altri streptococchi non potevano. Swan³ nel suo studio ha utilizzato il terreno esculina contenente il 4% di sale biliare.

Bile Aesculin Agar, preparato secondo la formulazione di Swan³ e raccomandato da APHA⁴ e MSDA⁵, viene utilizzato per il test di conferma delle colonie di enterococchi isolate dal cibo in base alla loro capacità di crescere e idrolizzare il glicoside esculina in presenza di bile.⁶ L'uso di questo terreno in combinazione con Triple Sugar Iron Agar e Lysine Iron Agar è stato proposto per differenziare il gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* da altre *Enterobacteriaceae*.⁷

Il peptone e l'estratto di carne forniscono azoto, carbonio, aminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica; i sali biliari sono agenti selettivi che limitano la crescita dei batteri Gram-positivi diversi dagli enterococchi; l'esculina viene idrolizzata da questo gruppo di batteri in glucosio ed esculetina (6-7diidrossicumarina): l'esculetina reagisce con il citrato ferrico per formare un complesso marrone scuro o nero.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 64 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto frequente agitazione, raffreddare a 47-50° e trasferire in capsule di Petri sterili. Non surriscaldare.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	ambra scuro, leggermente opalescente
pH (20-25°C)	6,4 ± 0.2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Bile Aesculin Agar	Terreno di coltura in polvere	4010172	500 g (7,8 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Anse sterili, incubatore e altra attrezzatura di laboratorio, beute Erlenmeyer, capsule di Petri sterili, reagenti e terreni di coltura accessori per completare l'identificazione dei ceppi isolati.

8 - CAMPIONI

Il campione è costituito da colonie batteriche isolate da alimenti o dalle acque mediante le tecniche usuali e cresciute su terreno selettivo per gli enterococchi.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare una piastra di Bile Aesculin Agar su tutti e quattro i quadranti con una singola colonia sospetta coltivata su terreno selettivo per enterococchi. Incubare per 18-24 ore a 37°C e verificare la formazione di un alone bruno attorno alle colone (positività all'idrolisi dell'esculina). Incubare le piastre negative per altre 18-24 ore.

10 - CONTROLLO QUALITÀ

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	37°C /18-24H-A	buona crescita, colonie grigie con alone marrone
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	37°C /18-24H-A	buona crescita, colonie grigie con alone marrone

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

11 - VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

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





La produttività è testata con il metodo semi-quantitativo ecometrico con i seguenti ceppi target: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 33186, *E. faecium* ATCC 19434, *E. hirae* ATCC 8043. Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore i ceppi target evidenziano colonie con annerimento del terreno.

La selettività è valutata con il metodo modificato di Miles-Misra, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali, di sospensioni in soluzione salina con densità pari a 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922. La crescita dei ceppi non target è parzialmente inibita dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore.

12 – LIMITI DEL METODO

- L'identificazione presuntiva degli enterococchi basata esclusivamente sul test della bile esculina e sulla crescita in brodo con NaCl può essere erronea, poiché sono stati isolati da infezioni umane ceppi di *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Vagococcus* con fenotipi similari.⁸
- Il test della Bile Esculina è stato originariamente utilizzato per identificare gli enterococchi. Tuttavia, altri streptococchi di gruppo D e occasionalmente streptococchi non di gruppo D e altri generi, *Aerococcus* e *Listeria*, possono tollerare la concentrazione biliare e scindere l'esculina.⁶
- Alcune specie di *viridans* sono in grado di scindere l'esculina: *S. sanguis*, *S. mutans* and *S. anginosus*, ma queste specie non possono di solito tollerare un aumento di concentrazione di bile del 4% e al contempo idrolizzare l'esculina.⁶
- Nel test di conferma eseguito con trasferimento su membrana filtrante, una distribuzione non uniforme delle colonie batteriche o la presenza di elevate cariche microbiche può interferire con la differenziazione delle colonie positive a causa della diffusione del colore nelle colonie adiacenti.
- Si consiglia di non prolungare l'incubazione oltre le 24 ore perché l'esteso annerimento del terreno ostacola la lettura.

13 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per 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 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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 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.
- 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 +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).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Rochemaix, A. Milieux a l'esculine pour le diagnostic differential des bacteries du groups strepto-enteropneumocoque. C R Soc Biol. 1924; 90:771-772.
2. Meyer K, Schonfeld H. Uber die Unterscheidung des Enterococcus vom Streptococcus viridans and die Beziehung beider zum Streptococcus lactis. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig. 1926; 99:402-416.
3. Swan A. The use of a bile-esculin medium and of Maxted's technique of Lancefield grouping in the identification of enterococci (group D streptococci). J Clin Pathol 1954; 7:160-163.
4. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2017.
5. Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA). Chapitre 56, Microbiologie. Juillet 2000
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Lindel SS, Quin P. Use of Bile-Esculin Agar for Rapid Differentiation of Enterobacteriaceae J Clin Microbiol. 1975; 1(5): 440-443
8. Teixeira LM et al. *Enterococcus*. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF o REF Numero di catalogo	 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	2022/07

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

