

## BRILLIANT GREEN AGAR

Terreno di coltura in polvere



Brilliant Green Agar: colonie di *Salmonella* spp. (rosse)  
e *E.coli* (gialle)

### 1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione di *Salmonella* spp. diverse da *Salmonella* Typhi

### 2 - COMPOSIZIONE

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

Peptocomplex	10,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Lattosio	10,0 g
Saccarosio	10,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Agar	20,0 g
Rosso fenolo	80,0 mg
Verde Brillante	12,5 mg

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

### 3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Originariamente descritto da Kristensen et al.<sup>1</sup>, Brilliant Green Agar è stato successivamente modificato da Kauffmann<sup>2</sup> per ottenere un terreno altamente selettivo per l'isolamento e l'identificazione di salmonelle da feci e altro materiale patologico, e da alimenti e prodotti lattiero-caseari.

La presenza del verde brillante può inibire la crescita di batteri enterici non patogeni e di *Shigella* spp., favorendo selettivamente la *Salmonella*, ad eccezione di *S.Typhi* e *S.Paratyphi*.<sup>3</sup> Per questo motivo, Brilliant Green Agar deve essere utilizzato in parallelo con altri terreni come MacConkey Agar e XLD Agar.

Il Peptocomplex e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita microbica; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico; il lattosio e il saccarosio sono carboidrati fermentabili; il rosso fenolo funge da indicatore acido-base dando un colore giallo ai batteri che fermentano il lattosio e/o il saccarosio mentre i batteri non fermentanti il lattosio sviluppano colonie da bianche a rosso rosate entro 18-24 ore dall'incubazione. Questo terreno contiene anche il verde brillante, che inibisce la crescita della maggior parte dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi, comprese le specie *Salmonella* Typhi e *Shigella*.

Watson<sup>4</sup> e Walker<sup>5</sup> hanno descritto una modifica di Brilliant Green Agar che riduce la crescita di contaminanti come *Citrobacter* spp, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* e *Proteus mirabilis* mediante l'aggiunta di sale sodico di sulfacetamide (1,0 mg/mL) e sale sodico di acido mandelico (0,25 mg/mL).

### 4-PREPARAZIONE

Sospendere 58 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Scaldare fino a completo scioglimento e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e distribuire in piastre Petri sterili.

### 5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, grigio-rosa
Aspetto del terreno in piastra	marrone-rossastro, limpido.
pH (20-25°C)	6,9 ± 0,2

### 6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Brilliant Green Agar	Terreno di coltura in polvere	4012552	500 g (8,6 L)

### 7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute Erlenmeyer, piastre Petri sterili, terreni di coltura ausiliari e reagenti per l'identificazione completa 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

Inoculare una piastra di Brilliant Green Agar con un inoculo pesante. Allo stesso tempo, inoculare altri terreni e provette di Selenite Broth e Tetrathionate Broth. Incubare la piastra Brilliant Green Agar per 18-24 ore a 35-37°C.

Esaminare le piastre e identificare le colonie sospette utilizzando test differenziali.

Se non si osservano batteri fermentanti il lattosio sulle colture primarie in piastra, inoculare Brilliant Green Agar e altri terreni con le colture arricchite e incubare come descritto sopra.

Esame degli alimenti:

Pre-arricchiare quattro aliquote da 25 g di campione in 75 ml di Buffered Peptone Water e incubare a 35°C per 4-6 ore.

Aggiungere a ciascun campione 75 mL di Selenite Cystine Broth a doppia concentrazione e incubare a 43°C per 24 ore.

Trasferire in piastre di Brilliant Green Agar e Bismuth Sulphite Agar.

Incubare le piastre a 35°C ed esaminare il Brilliant Green Agar dopo 24 ore e il Bismuth Sulphite Agar dopo 48 ore.





### 10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie. *Salmonella* spp. di specie diverse da *S.Typhi* e *S.Paratyphi A* formano colonie opache di colore rosso-rosato-bianco, circondate da un diffuso alone rosso.

*E. coli/Klebsiella/Enterobacter* crescono meno rigogliosamente e formano colonie giallo-verdi, circondate da un alone dello stesso colore. *Proteus* non sciama se vengono inoculate piastre asciutte e produce colonie mucoidi giallo-rosate (fermentazione del saccarosio, variabile).

*Shigella* è completamente inibita dal verde brillante.

### 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>S.Enteritidis</i> ATCC 13076	35-37°C/18-24 H/A	buona crescita, colonie rosse con alone rosso
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	35-37°C/18-24 H/A	buona crescita, colonie rosse con alone rosso
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-37°C/18-24 H/A	crescita scarsa, colonie gialle
<i>E.faecalis</i> ATCC 19433	35-37°C/18-24 H/A	parzialmente inibito

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

### 12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione in commercio, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Brilliant Green Agar viene valutato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

Le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target: *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.Enteritidis* ATCC 13076, *S.arizonae* ATCC 13314. Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore i ceppi target presentano colonie rosse con alone rosso.

La selettività è valutata con il metodo della goccia superficiale 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: *P.vulgaris* ATCC 9484, *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212. La crescita di *E.coli* è parzialmente inibita mentre la crescita di *E.faecalis* e *P.vulgaris* è totalmente inibita dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore.

### 13-LIMITI DEL METODO

- Le colonie di *Salmonella* spp. variano da rosso-rosa-bianco a seconda della durata dell'incubazione e del tipo di ceppo; tuttavia, uno qualsiasi di questi colori indica un ceppo non fermentante il lattosio.<sup>3</sup>
- S.Typhi*, *S.Paratyphi* e *Shigella* non crescono adeguatamente su questo terreno.<sup>3</sup>
- I ceppi lenti nella fermentazione del lattosio, *Proteus*, *Citrobacter* e *Pseudomonas* possono crescere su Brilliant Green Agar con colonie rosse che imitano i patogeni enterici.<sup>3</sup> Si consiglia di osservare le colonie inondando la piastra con una goccia di MUCAP Test reagent (REF 191500) e osservando dopo 3 - 5 min alla lampada di Wood per lo sviluppo della fluorescenza, prodotta in presenza dell'enzima C8 esterasi, tipico di *Salmonella* spp.<sup>6</sup>
- Poiché il terreno è altamente selettivo, si raccomanda l'inoculo simultaneo di terreni meno selettivi come MacConkey Agar e XLD Agar insieme a un brodo di arricchimento.<sup>3</sup>
- Il terreno è normalmente di colore bruno rossastro; dopo l'incubazione diventa rosso vivo ma torna al colore normale a temperatura ambiente.<sup>3</sup>
- 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 (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

**16- BIBLIOGRAFIA**

- Kristensen M, Lester V, Jurgens A. On the use of trypsinized casein, brom thymol blue, brom cresol purple, phenol red and brilliant green for bacteriological nutrient media. Br J Exp Pathol 1925; 5:291
- Kauffmann F. Weitere Erfahrungen mit den kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen. Z. Hyg. Infektionskr. 1935; 117: 26.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- Watson C, Walker AP. A modification of brilliant green agar for improved isolation of Salmonella J Appl Bacteriol. 1978 Oct;45(2):195-204.
- Walker AP. A note of the inhibition of Pseudomonas aeruginosa by a modification of brilliant green agar for improved salmonella isolation J Appl Bacteriol. 1981 Dec;51(3):405-8.
- Ruiz J, Sempere MA, Varela C, Gomez J. Modification of the methodology of stool culture for Salmonella detection, J Clin Microbiol 1992; 30:525-526

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

<b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	<b>LOT</b> 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 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2022

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

