

BRILLIANT GREEN AGAR MODIFIED

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

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*

Estratto di manzo	5,0 g
Peptone	10,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Disodio idrogeno fosfato	1,0 g
Sodio diidrogeno fosfato	0,6 g
Lattosio	10,0 g
Saccarosio	10,0 g
Agar	13,0 g
Rosso fenolo	90,0 mg
Verde Brillante	4,7 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.¹, Brilliant Green Agar è stato successivamente modificato da Kampelmacher^{2,3} presso l'Istituto Nazionale di Sanità Pubblica di Utrecht, per ottenere un terreno altamente selettivo per l'isolamento delle salmonelle dal muso dei suini e dalla carne macinata.

Brilliant Green Agar Modified è stato raccomandato per l'isolamento della *Salmonella*, diversa da *S.Typhi*, dall'acqua e dai materiali associati⁴, dal pollame e dai prodotti a base di pollame⁵. È incluso nella ISO 6579 come secondo terreno selettivo per il rilevamento della *Salmonella* negli alimenti.⁶

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*.³ Per questo motivo, Brilliant Green Agar deve essere utilizzato in parallelo con altri terreni come MacConkey Agar e XLD Agar.

Il Peptone, l'estratto di manzo e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita microbica; i fosfati fungono da sistema tampone; 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*.

4-PREPARAZIONE

Sospendere 52,7 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente. Raffreddare a 47-50°C e distribuire in piastre Petri sterili. Non sterilizzare in autoclave.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, rosso-arancio
Aspetto del terreno in piastra	rosso-arancio, limpido.
pH (20-25°C)	6,9 ± 0,1

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Brilliant Green Agar Modified	Terreno di coltura in polvere	4012562	500 g (9,5 L)
Brilliant Green Agar Modified	Piastre pronte all'uso	541256	2 x 10 piastre ø 90 mm

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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

L'individuazione della *Salmonella* negli alimenti richiede quattro fasi successive:⁶

- 1- Pre-arricchimento in Buffered Peptone Water inoculata con il campione, quindi incubata tra 34°C e 38°C per 18 ore.
- 2- Arricchimento in brodo selettivo. Rappaport-Vassiliadis Soy Broth (brodo RVS) o Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) e il Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (brodo MKTTn) vengono inoculati con la coltura ottenuta in Buffered Peptone Water. Il brodo RVS o l'agar MSRV vengono incubati a 41,5°C per 24 ore e il brodo MKTTn a 37°C per 24 ore.





- 3- Inoculo su supporti solidi selettivi. Dalle colture ottenute dal brodo di arricchimento selettivo, vengono inoculati i seguenti due terreni solidi selettivi:
- Xylose Lysine Deoxycholate agar (agar XLD);
 - qualsiasi altro terreno selettivo solido complementare all'agar XLD (ad esempio, Brilliant Green Agar Modified).
- Le piastre XLD agar e Brilliant Green Agar Modified vengono incubate a 37 °C ed esaminate dopo 24 ore.
- 4- Conferma. Le colonie di presunta *Salmonella* sono subcoltivate e la loro identità è confermata mediante appropriati test biochimici e sierologici.

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
S.Enteritidis ATCC 13076	35-37°C/18-24 H/A	buona crescita, colonie rosse con alone rosso
S.Typhimurium ATCC 14028	35-37°C/18-24 H/A	buona crescita, colonie rosse con alone rosso
E.coli ATCC 25922	35-37°C/18-24 H/A	crescita scarsa, colonie gialle
E.faecalis 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 Modified 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. 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 19433, *S.aureus* ATCC 25923. La crescita di *S.aureus* è totalmente inibita mentre la crescita degli altri ceppi non-target, è parzialmente 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.³
- *S.Typhi*, *S.Paratyphi* e *Shigella* non crescono adeguatamente su questo terreno.³
- I ceppi lenti nella fermentazione del lattosio, *Proteus*, *Citrobacter* e *Pseudomonas* possono crescere su Brilliant Green Agar Modified con colonie rosse che imitano i patogeni enterici.³ 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.⁶
- 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.³
- 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 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.
- Ogni piastra pronta per l'uso di questo terreno di coltura è esclusivamente monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- 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.
- 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**Terreno disidratato**

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).

Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare le piastre nella loro confezione originale a +2 / +8°C al riparo dalla luce diretta. Se correttamente conservate, le piastre possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Non utilizzare le piastre oltre questa data. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate per 7 giorni se conservate in un'area pulita a +2 / +8°C. Non utilizzare le piastre se la busta di plastica è danneggiata. Non utilizzare le piastre con segni di deterioramento (ad es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimento o screpolatura del terreno, colore atipico, eccesso di umidità).

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).

Secondo MacFaddin⁷ le piastre preparate in laboratorio possono essere conservate a +2°C /+8°C al buio e protette contro l'evaporazione fino a 6-8 settimane.

16- BIBLIOGRAFIA

1. 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
2. Edel W, Kampelmacher EH. Comparative studies on Salmonella isolation in eight European Laboratories. Bull Wld Hlth Org 1968; 39, 487-491.
3. Edel W, Kampelmacher EH. Salmonella isolation in nine European laboratories using a standardized technique. Bull Wld Hlth Org 1969; 41, 297 - 306.
4. H. M. S. O. Methods for the isolation and identification of salmonellae (other than Salmonella typhi) from water and associated materials. 1982
5. British Poultry Meat Society. A manual of recommended methods for the microbiological. 1982
6. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp
7. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
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

 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	06/2022
Revisione 7	Aggiunta delle piastre pronte all'uso, modifica dei capitoli 6, 12, 14, 15	12/2022

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

