



BRYANT BURKEY BROTH BASE WITH RESAZURIN

Terreno di coltura in polvere

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno per il rilevamento e il conteggio delle spore dei clostridi fermentanti il lattato.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Tryptone	15,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Estratto di carne	7,5 g
Sodio acetato	5,0 g
Cisteina HCl	0,5 g
Resazzurrina	2,5 mg

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

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Bryant and Burkey Medium si basa sul terreno di fermentazione del lattato descritto da Rosenberger¹ e Bryant e Burkey², modificato da Bergère³. Bryant Burkey Broth Base with Resazurin è preparato secondo la formulazione raccomandata da CNERNA⁴.

È adatto per la conta delle spore di clostridi fermentanti il lattato negli insilati, nel latte e derivati ed in particolare per la rilevazione del *Clostridium tyrobutyricum* responsabile del "rigonfiamento tardivo" nei formaggi semiduri e duri salati. Il gas prodotto dalla crescita dei clostridi gonfia il formaggio ed è responsabile di un difetto noto come rigonfiamento butirrico, con conseguente cattivo gusto.

Il triptone, l'estratto di lievito e l'estratto di manzo forniscono azoto, carbonio, vitamine, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. La L-cisteina è l'agente riducente e la resazzurrina è un indicatore redox e controlla il livello di ossigeno. L'acetato di sodio favorisce la germinazione delle spore, che viene attivata dal trattamento termico del campione e migliora la selettività del terreno. Il lattato di sodio non è incluso nel terreno quindi deve essere aggiunto; il lattato di sodio, in presenza di acetato di sodio, viene fatto fermentare in condizioni anaerobiche da *C.tyrobutyricum* e altri clostridi fermentanti il lattato in acido butirrico, acido acetico e gas (CO₂ e H₂). La produzione di gas è dimostrata da un movimento verso l'alto di un tampone di paraffina che è appoggiato al terreno.

4-PREPARAZIONE

Sospendere 33 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda e aggiungere 10 g di soluzione di lattato di sodio al 50%. Portare ad ebollizione agitando frequentemente. Distribuire 10 ml in provette 16x160 mm. e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	limpido, marrone chiaro - rossastro
pH (20-25°C)	5,9 ± 0,1

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Bryant Burkey Broth Base with Resazurin	Terreno di coltura in polvere	4012692	500 g (15,1 L)

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatrice e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, provette, beute Erlenmeyer, terreni di coltura ausiliari e reagenti, soluzione di lattato di sodio al 50%.

8-CAMPIONI

Campioni di latticini decontaminati mediante riscaldamento per 10 minuti a 75°C in modo da distruggere tutte le forme vegetative. Per informazioni dettagliate sulle procedure di raccolta e manipolazione dei campioni, consultare i testi appropriati.⁴

9-PROCEDURA DELL'ANALISI

- Raffreddare le provette a 25°C dopo la sterilizzazione in autoclave o rigenerare le condizioni anaerobiche riscaldando le provette a 100°C per 10 minuti se il terreno appare rosa per più di 1/3 della sua altezza. Non ripetere l'operazione più di una volta.
- Inoculare le provette incolori con 1 mL di campione e 1 mL delle sue diluizioni decimali utilizzando il metodo MPN con cinque provette.
- Coprire il terreno con 2 mL (1,5-2 cm) di paraffina sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti e raffreddata a 58-60°C.
- Riscaldare le provette a 75°C per 10 minuti per distruggere le forme vegetative e attivare la germinazione delle spore.
- Raffreddare rapidamente le provette in un bagno di acqua ghiacciata per solidificare la paraffina.
- Incubare le provette inoculate a 37°C per un massimo di 7 giorni. Valutare le provette ogni 48 ore.

10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione osservare la presenza di crescita (torbidità del mezzo) e la formazione di gas.

Sono considerate positive le provette con accrescimento e formazione di gas indicati da un rialzo di 1 cm del tampone di paraffina.⁴

Calcolare il numero di *Clostridium* spp da tabelle/software MPN.

11-CONTROLLO QUALITA'

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 facoltà 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
C. tyrobutyricum ATCC 25755

INCUBAZIONE/ T°/ t/ ATM
35-37° / 44-48H /AN

RISULTATI ATTESI
crescita con produzione di gas

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 Bryant Burkey Broth Base with Resazurin addizionato con una soluzione di lattato di sodio al 50%, viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo di diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di organismi bersaglio in provette, incubando a 35-37°C per 44-48 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita e la produzione di gas nel lotto di riferimento (GrRB) e nel lotto da testare (GrTB). La produttività è testata con i seguenti ceppi: *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, *C. perfringens* ATCC 13124 e *C. sporogenes* ATCC 3584. L'indice di produttività GrRB - GrTB per ciascun ceppo di prova deve essere ≤ 1. *C. tyrobutyricum* e *C. perfringens* mostrano una crescita con produzione di gas mentre *C. sporogenes* cresce senza produzione di gas.

13-LIMITI DEL METODO

- Le esigenze nutrizionali dei microrganismi possono essere diverse, è quindi possibile che alcuni ceppi microbici non crescano o crescano poco.
- Per la purificazione della coltura e per eseguire test di identificazione sono necessarie subcolture su terreni solidi idonei.

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.
- 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

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 e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16-BIBLIOGRAFIA

- Rosenberger KF. The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage. Proc Soc Appl Bacteriol 1951;14:161-164
- Bryant MP, Burkey LA. The characteristics of lactate-fermenting sporeforming anaerobes from silage. J Bacteriol 1956; 71: 43-46
- Bergère JL, Gouet P, Hermier J, Mocquot G. Les Clostridium du groupe butyrique dans les produits laitiers. Ann Inst Pasteur 1968;19: 41-54
- CNERNA (Commission « Qualité Bactériologique du lait » du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation): Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de Clostridia par la méthode de culture en milieu liquide. Revue Laitière Française 1986; 451:39-45.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	07/2022

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

