

**CHAPMAN STONE MEDIUM**

Terreno di coltura in polvere

*S. aureus* su Chapman Stone Medium**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione degli stafilococchi.

**2 - COMPOSIZIONE****FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOLIMENTO IN ACQUA) \***

Triptone	10 g
Estratto di lievito	2 g
Gelatina	30 g
Mannitol	10 g
Sodio cloruro	55 g
Ammonio solfato	75 g
Potassio fosfato monobasico	5 g
Agar	15 g

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

**3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

Chapman Stone Medium è preparato sulla base della formulazione descritta da Chapman<sup>1</sup> nel 1948, che rappresentava una modifica del terreno Chapman Staphylococcus Medium descritto nel 1946<sup>2</sup>, nella quale l'ammonio solfato era incorporato nel terreno, piuttosto che aggiunto alla piastra dopo incubazione. Il terreno fu sviluppato da Chapman a seguito delle osservazioni di Stone<sup>3</sup> del 1935 sulla positività al test della gelatinasi degli stafilococchi implicati in episodi di tossinfezione alimentare.

Chapman Stone Medium è un terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione degli stafilococchi, sulla base della tolleranza ad alte concentrazioni di sodio cloruro, della fermentazione del mannitol e della liquefazione della gelatina. Il terreno è indicato per studi su episodi di tossinfezioni alimentari sostenuti da stafilococchi.<sup>4</sup> Chapman Stone Medium è inserito da Atlas nelle rassegne dei terreni di coltura per l'esame degli alimenti<sup>5</sup> e dei campioni ambientali<sup>6</sup>.

Il triptone e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, minerali e vitamine per la crescita microbica. Il potassio fosfato agisce da sistema tampone. La selettività del terreno è dovuta all'alto contenuto di NaCl (5,5%) che permette una buona crescita degli stafilococchi patogeni ed una inibizione da parziale a totale dei batteri gram negativi e degli enterococchi. Il mannitol è inserito nel terreno come carboidrato fermentabile: *Staphylococcus aureus* fermenta il mannitol producendo una acidificazione del terreno attorno alla colonia; per evidenziare tale acidificazione si asporta la colonia e sull'area si deposita una goccia di porpora di bromo-cresolo: il viraggio dell'indicatore al giallo indica l'avvenuta fermentazione del mannitol. La gelatina consente di evidenziare le proprietà gelatino-litiche degli stafilococchi; il terreno possiede, in condizioni normali, un aspetto biancastro e lattescente, a causa dei precipitati che si formano tra la gelatina e l'ammonio solfato; attorno alle colonie dei microrganismi che hanno liquefatto la gelatina, l'aspetto del terreno cambia notevolmente ottenendosi un alone di chiarificazione per l'assenza dei suddetti precipitati.

**4 - METODO DI PREPARAZIONE**

Sospendere 202 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e distribuire in piastre di Petri sterili.

**5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in soluzione	giallastro, a fiocchi
Aspetto del terreno in piastra	giallastro, opaco
pH (20-25°C)	7,0 ± 0,2

**6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chapman Stone Medium	Terreno di coltura in polvere	4013002	500 g (2,5 L)

**7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per identificazione delle colonie.

**8 - CAMPIONI**

Fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili per la raccolta dei campioni alimentari.

Seguire le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

**9 - PROCEDURA DELL'ANALISI**

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.

Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate, assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare a 30-35°C per 48 ore in aerobiosi.





### 10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie. La differenziazione presuntiva tra *S.aureus* ed *S.epidermidis* è effettuata con la lettura dei test della fermentazione del mannitol e di liquefazione della gelatina (gelatinasi).

Gelatinasi: formazione di un alone di chiarificazione attorno alle colonie.

Fermentazione del mannitol: rimuovere la coltura dalla piastra e depositare sull'area una goccia di soluzione di bromo cresolo porpora 0,04%; il viraggio al giallo dell'indicatore indica l'avvenuta fermentazione del mannitol.

Le colonie di colore giallo-arancio, gelatinasi positive e mannitol positive sono identificate presuntivamente come *S.aureus*.

Le colonie bianche, gelatinasi positive e mannitol negative sono probabilmente *S.epidermidis*.

Confermare l'identificazione presuntiva di *S.aureus* con test addizionali, come la coagulasi: prelevare con una ansa la coltura dalla superficie del terreno, seminare in una provetta di Nutrient Broth o di BHI Broth o su piastra di agar-sangue ed incubare per 18-24 ore a 30-35°C; emulsionare 0,5 mL di brodo coltura o una coltura da agar-sangue con 0,5 mL di plasma di coniglio (Coagulase Plasma EDTA cat. n. 429937). Incubare a 35-37°C ed osservare la formazione del coagulo dopo 3-6 ore e, nel caso di risultato negativo dopo 24 ore. L'alta concentrazione salina del terreno Chapman Stone Medium può interferire con la reazione della coagulasi, rendendosi quindi necessaria la sub-coltura.

### 11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	30-35°C / 44-48 H / A	crescita, colonie con alone trasparente, mannitol positive
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	30-35°C / 44-48 H / A	crescita, colonie con alone trasparente, mannitol negative
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30-35°C / 44-48 H / A	crescita inibita

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

### 12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Chapman Stone Medium vengono testati per la produttività, la specificità e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 30-35°C per 44-48 ore, con 2 ceppi target ATCC (*S.aureus* ATCC 25923 e *S.aureus* ATCC 6538) e con 2 ceppi di *S.aureus* di isolamento clinico. Le colonie di *S.aureus* appaiono giallastre circondate da una zona di chiarificazione del terreno e sono positive al test della fermentazione del mannitol eseguito con una soluzione di bromo cresolo porpora; sono anche valutate le cariche microbiche di questi ceppi e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi alle specifiche.

La specificità del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 30-35°C per 44-48 ore, con il ceppo *S.epidermidis* ATCC 12228. Dopo incubazione, il ceppo coltiva con colonie biancastre, circondate da una zona di chiarificazione del terreno e sono negative al test della fermentazione del mannitol, eseguito con una soluzione di bromo cresolo porpora; sono anche valutate le cariche microbiche e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi alle specifiche.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non-target *E.faecalis* ATCC 19433, *E.coli* ATCC 25922 e *P.vulgaris* ATCC 9484. Dopo incubazione a 30-35°C per 44-48 ore in aerobiosi, i ceppi non target risultano completamente inibiti alla diluizione  $10^{-1}$ .

### 13 - LIMITI DEL METODO

- *Enterococcus faecalis* ed altri enterococchi possono esibire crescita sul terreno con una debole reazione di fermentazione del mannitol; le colonie sono comunque minuscole e sono facilmente differenziabili con la colorazione Gram e con il test della catalasi; enterococchi: cocci in corte o lunghe catenelle, catalasi negativi, stafilococchi: cocci a grappoli, catalasi positivi.<sup>4</sup>
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa.

### 14 - 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](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.
- 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](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. Chapman GH. An Improved Stone medium for the isolation and testing of food-poisoning Staphylococci. Food Res 1948; 13:100.
2. Chapman GH. A single culture medium for selective isolation of plasma-coagulating staphylococci and for improved testing of chromogenesis, plasmocoagulation, mannitol fermentation, and the Stone reaction. J Bacteriol 1946; 51:409-410.
3. Stone RV. A cultural method for classifying Staphylococci as of the "food poisoning" type. Proc Soc Exper Biol Med 1935; 33:185-187.
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. Atlas R. The Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food. CRC Press, 1995
6. Atlas R. The Handbook of Microbiological Media for Environmental Microbiology. CRC Press, 1995

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 4	Modifiche a: "destinazione d'uso, "precauzioni ed avvertenze", "limiti del metodo", "conservazione e validità"	05/2022

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

