

EDWARDS AESCULIN MEDIUM

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per l'isolamento rapido di *Streptococcus agalactiae* e altri streptococchi associati a mastite bovina.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA *

Estratto di carne	10,00 g
Peptocomplex	10,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Esculina	1,00 g
Tallio solfato	0,33 g
Agar	15,00 g
Violetto cristallo	1,30 mg

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La mastite bovina è una risposta infiammatoria del tessuto mammario dovuta a traumi fisici o infezioni da microrganismi.¹ È considerata la malattia più comune che porta a perdite economiche nelle industrie lattiero-casearie a causa della resa ridotta e della scarsa qualità del latte.^{1,2}

Molte specie batteriche sono state identificate come agenti eziologici della mastite bovina e, tra queste, gli streptococchi e in particolare lo *Streptococcus agalactiae* giocano un ruolo chiave. *S. agalactiae* è un patogeno Gram-positivo noto per causare la mastite bovina ancora prima che fosse identificato come patogeno nell'uomo.³ Può essere trasmesso attraverso la mungitrice e per via oro-fecale, in particolare attraverso l'acqua potabile contaminata.¹

Nel 1933, Edwards⁴ utilizzò un agar sangue con esculina contenente cristal violetto e sodio azide per isolare gli streptococchi della mastite. Un terreno simile contenente acetato di tallio è stato utilizzato da McKenzie⁵ per isolare l'agente eziologico della mastite. In Edwards Aesculin Medium il cristal violetto e il solfato di tallio sono gli agenti selettivi che sopprimono la crescita di un'ampia varietà di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, ad eccezione degli streptococchi. I fattori essenziali per la crescita microbica sono forniti dall'estratto di manzo e dal peptocomplex. Il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico. L'esculina differenzia i microrganismi esculina-positivi (streptococchi di gruppo D che crescono con colonie nere) dai microrganismi esculina-negativi (*S. agalactiae* che crescono con colonie da blu a incolore). L'aggiunta di sangue fornisce ulteriori fattori di crescita e differenzia gli streptococchi sulla base del pattern emolitico.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 41,3 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere asetticamente il 5-7% di sangue di montone defibrinato sterile. Mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, grigio-viola
Aspetto della soluzione	viola, limpida
Aspetto del terreno in piastra	rosso, opaco
pH finale (20-25 °C)	7,3 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Edwards Aesculin Medium	Terreno di coltura in polvere	4014312	500 g (12,1 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, piastre Petri, beute, sangue di montone defibrinato, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Campioni di latte. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare i fondelli dei campioni di latte centrifugati e strisciare con un'ansa sui quattro quadranti della piastra per ottenere colonie ben isolate, assicurandosi che le sezioni 1 e 4 non si sovrappongano. Incubare a 35-37°C per 24-48 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie isolate. *S. agalactiae* cresce con colonie da blu a incolore, tipicamente beta emolitiche.

Gli streptococchi di gruppo D crescono con colonie non emolitiche da nere a marroni (esculinasi positive).

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente finale può eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO

INCUBAZIONE T° / T / ATM

RISULTATI ATTESI





<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	35-37°C / 18-24h / A
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	35-37°C / 18-24h / A
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24h / A

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

crescita, colonie da blu a incolori, β-emolitiche
crescita, colonie da marone a nero, non-emolitiche
inibito

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Edwards Aesculin Medium disidratato e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semi-quantitativa con i seguenti ceppi target: *S. agalactiae* ATCC 13813, *S. agalactiae* ATCC 12386, *S. agalactiae* CB STR6.2. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie da blu a incolori. I ceppi CB STR6.2 e ATCC 12386 mostrano β emolisi mentre il ceppo ATCC 13813 non è emolitico. La specificità è valutata con *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo l'incubazione il ceppo cresce con colonie da nere a marroni non emolitiche. La selettività è valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922. La crescita di il ceppo non target è totalmente inibito dopo incubazione a 37°C per 24 ore

Nota: CB: Collezione microbica Biolife

13 – LIMITE DEL METODO

- Anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, da coltura pura, per una completa identificazione.

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 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.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi 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.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Wei Nee Cheng, Sung Gu Han. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *As-Austral J Anim Sci.* 2020 Nov; 33(11): 1699–1713.
2. Gomes F, Henriques M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Curr Microbiol.* 2016;72:377–82.
3. Morven S, Edwards, Carol J. Baker, in *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn (Seventh Edition)*, 2011.
4. Edwards SJ. *J. Comp. Pathol. Therap.* 1933; 46:211-217.
5. McKenzie DA. *Vet. Rec.* 1941; 53: 473-480.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF o REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbrikante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

