

GIOLITTI CANTONI STAPHYLOCOCCI BROTH

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Brodo di arricchimento selettivo per la ricerca e il conteggio degli stafilococchi coagulasi-positivi negli alimenti

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Triptone	10,0 g
Estratto di carne	5,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Litio cloruro	5,0 g
Mannitolo	20,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Glicina	1,2 g
Sodio piruvato	3,0 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Staphylococcus aureus è stato identificato come l'agente eziologico in molti focolai di intossicazione alimentare. Gli alimenti trasformati possono contenere un numero relativamente piccolo di cellule vitali debilitate, la cui presenza deve essere dimostrata con metodi appropriati.

Il brodo Giolitti Cantoni Staphylococci Broth si basa sulla formulazione ideata dai microbiologi italiani Giovanni Giolitti e Carlo Cantoni per il recupero di un basso numero di *S.aureus* stressato negli alimenti^{1,2}, adottata anche da Mossel³ per la rilevazione di *S.aureus* nel latte in polvere e negli alimenti per neonati.

È raccomandato dalla norma ISO 6888-34 per il rilevamento o il conteggio con la tecnica MPN degli stafilococchi coagulasi positivi negli alimenti, dove si prevede che gli stafilococchi siano stressati e in numero ridotto. Rispetto alla formula classica di Giolitti e Cantoni, il terreno proposto dalla ISO 6888-3 contiene in aggiunta monooleato di sorbitano.

I fattori di crescita essenziali sono forniti dal triptone, dall'estratto di carne e dall'estratto di lievito. Il D-mannitolo è la fonte di carboidrati. Il piruvato di sodio e il monooleato di sorbitano aiutano la rivitalizzazione delle cellule stressate. Il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico. I batteri Gram-negativi sono inibiti dal cloruro di litio mentre i contaminanti Gram-positivi sono inibiti dalla combinazione di glicina e tellurito di potassio aggiunti alla base del terreno. Le condizioni anaerobiche create dall'olio di paraffina stratificato nelle provette, limitano la crescita dei micrococchi. Il tellurito viene ridotto a tellurio da *S.aureus* e specie affini, conferendo al terreno un colore nero.⁵

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 54,2 g (o 108,4 g nel caso di terreno a doppia concentrazione) in 1000 mL di acqua purificata fredda. Se necessario, aggiungere 1 mL (2 mL nel caso di terreno a doppia concentrazione) di sorbitan monooleato (Tween 80 REF 42120502). Riscaldare leggermente per sciogliere completamente la polvere. Dispensare il terreno a concentrazione singola in aliquote da 9 mL in provette di dimensioni adeguate (ad es. 16 mm x 160 mm) e 10 mL di terreno a doppia concentrazione in provette da 20 mm x 200 mm. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a una temperatura compresa tra 44 °C e 47 °C e aggiungere asepticamente a ciascuna provetta di terreno a concentrazione singola 0,1 mL di una soluzione di tellurito di potassio all'1% sterilizzata per filtrazione (REF42211501) (0,2 mL a un terreno a concentrazione doppia).

Dopo l'inoculazione, coprire la superficie del brodo in provetta con uno strato di 30 mm di agar sterile o olio di paraffina.

Se il terreno di base viene conservato prima dell'aggiunta della soluzione di potassio tellurito, poco prima dell'uso riscaldarlo per 15 minuti a 100 °C per eliminare l'aria.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto della soluzione	gialla, limpida
pH finale (20-25 °C)	6,9 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Giolitti Cantoni Staphylococci Broth	Terreno di coltura in polvere	4015162	500 g (9,2 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette, monooleato di sorbitano (Tween 80 REF 42120502), soluzione di potassio tellurito 1% (REF 42211501), olio di paraffina, agar Bios LL (REF 411030), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nel settore della produzione alimentare e della manipolazione degli alimenti. 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.⁴

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

1. Seguendo la procedura per l'isolamento e il conteggio tramite MPN fornita dalla norma ISO 6888-3⁴, inoculare 9 mL di brodo Giolitti Cantoni Staphylococci Broth a singola concentrazione con 1 g o 1 mL della sospensione iniziale o 10 mL di brodo a doppia concentrazione con 10 mL o campione da 10 g. Per volumi maggiori di campione, aggiungere il campione di X g o X mL a 9 x g o 9 x mL di brodo a concentrazione singola, precedentemente privato dell'aria e addizionato con potassio tellurito, avendo cura di ottenere un volume d'aria minimo nel flacone o nel contenitore.





2. Procedere come sopra specificato per ognuna delle successive diluizioni.
3. Miscelare accuratamente l'inoculo e il terreno, evitando in ogni caso l'introduzione di aria.
4. Versare con cautela uno strato di agar, raffreddato a una temperatura compresa tra 44 °C e 47 °C, sulla parte superiore del terreno in ogni provetta inocolata e lasciarlo solidificare per formare un sigillo. È possibile utilizzare uno strato di 30 mm di olio di paraffina sterile al posto della soluzione di agar.
5. Incubare le provette inocolate a 37 °C ± 1 °C per 24 h ± 2 h. Effettuare una sottocoltura di tutte le provette che mostrano annerimento o precipitato nero.
6. Incubare il resto delle provette inocolate per altre 24 h ± 2 h e subcoltivare tutte le provette (cioè quelle che sviluppano o meno un precipitato nero dopo 48 h ± 2 h).
7. Per la subcoltura, rimuovere asepticamente il tappo di agar o paraffina utilizzando una spatola sterile.
8. Con un'ansa sterile, seminare ciascun brodo selezionato sulla superficie di piastre di Baird Parker Agar (REF 541116) o Baird Parker RPF Agar (REF 543101) in modo da ottenere colonie isolate. Capovolgere le piastre inocolate e incubare a 37 °C ± 1 °C per 24 h ± 2 h e 48 h ± 2 h.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La formazione di un precipitato nero o l'annerimento del brodo suggeriscono la presenza di stafilococchi coagulasi positivi. Per la lettura e l'interpretazione dei terreni inoculati e per i test di conferma, consultare le istruzioni per l'uso di Baird Parker Agar e Baird Parker RPF Agar e seguire la procedura indicata da ISO 6888-3.⁴

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di ogni prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione dei test del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore 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 riportati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità del terreno di coltura.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	37°C/48 H/A	crescita, annerimento del brodo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C/48 H/A	nessuna crescita dopo coltura su Tryptic Soy Agar

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Giolitti Cantoni Staphylococci Broth disidratato viene testato per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 37°C per 48 ore e registrando la diluizione più alta con crescita e annerimento sia nel lotto di riferimento (G_{RB}) che nel lotto testato (G_{TB}). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* CBS100, *S. aureus* CBS6. L'indice di produttività G_{RB}/G_{TB} per ciascun ceppo di prova è ≤ 1 e le provette presentano un buon annerimento. La produttività e la selettività sono testate insieme a miscele di ≤ 100 UFC di organismi target e ≥ 1000 UFC di organismi non target per provetta, incubando a 37°C per 48 ore. Miscele di ceppi target e non target: *S. aureus* ATCC 25923 + *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 6538 + *E. coli* ATCC 25922. Dopo l'incubazione delle provette inocolate e la subcoltura su piastre di Baird Parker Agar, i ceppi target mostreranno più di 10 colonie per piastra.

Inoltre, la selettività viene testata inoculando ≥ 1000 UFC per tubo dei seguenti ceppi non target: *E. faecalis* ATCC 19433 e *E. coli* ATCC 25922. Dopo l'incubazione la crescita dei ceppi non target è parzialmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- Molta letteratura ha dimostrato che esistono sia risultati falsi negativi che falsi positivi del test di riduzione del tellurito (annerimento del terreno) e quindi tutte le provette devono essere confermate su agar selettivi.⁴
- L'enzima coagulasi è prodotto principalmente da *S. aureus* ma anche *Staphylococcus intermedius* e alcuni ceppi di *Staphylococcus hyicus* sono positivi al test della coagulasi.⁴

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura deve essere utilizzato secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede 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 Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza 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 dei prodotti, 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'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo Curtis GDW et al. il terreno base preparato in laboratorio può essere conservato 2 settimane a +4°C, mentre il terreno completo deve essere utilizzato lo stesso giorno della preparazione.⁵

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Giolitti G, Cantoni C. Att Soc Sci Vet 1965;19: 509
2. Giolitti G, Cantoni C. A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. J Appl Bacteriol 1966 Aug; 29(2):395-8
3. Mossel DAA, Harrewijn GA, Elzebroek JM. 1973 UNICEF
4. ISO 6888-3:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – part 3: MPN technique for low number.
5. Curtis GDW, Baird RM. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology: Additional Monographs (II) Proceedings of the 6th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Heidelberg 30 March-3 April, 1992. Int J Food Microbiol 1993; 17:247-8.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 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 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2023

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

