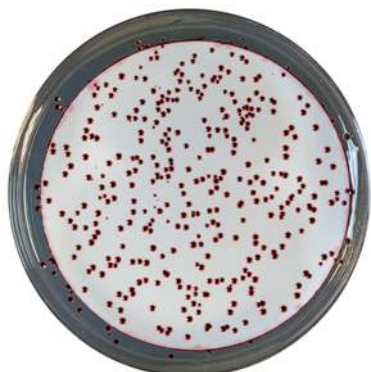


SLANETZ BARTLEY AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso



Slanetz Bartley Agar: colonie di *Enterococcus faecalis*

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo e differenziale per il conteggio degli enterococchi in campioni di acque e in altri materiali mediante la tecnica della filtrazione su membrana.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

TERRENO IN POLVERE E PRONTO ALL'USO

Triptosio	20,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Glucosio	2,00 g
Potassio fosfato bibasico	4,00 g
Sodio azide	0,40 g
Trifenil tetrazolio cloruro (TTC)	0,10 g
Agar	10,00 g

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

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Slanetz Bartley Agar è un terreno selettivo e differenziale preparato secondo la formulazione ideata da Slanetz, Bent e Bartley¹ e successivamente modificata da Slanetz e Bartley² con l'introduzione del trifeniltetrazolio cloruro (TTC). Lo Slanetz Bartley Agar, chiamato anche mEnterococcus Agar o m-Azide Agar, soddisfa i requisiti della norma ISO 7899-2³ e dell'APHA⁴ per il conteggio degli enterococchi intestinali in acqua mediante la tecnica della filtrazione su membrana. Burkwall e Hartman⁵ hanno dimostrato che l'aggiunta di 0,5 mL di Tween 80 e di 20 mL di una soluzione di carbonato o bicarbonato di sodio al 10% per ogni litro di terreno di coltura si è rivelata utile nell'analisi degli enterococchi negli alimenti congelati. Il metodo descritto nella norma ISO 7899-2 prevede il conteggio degli enterococchi intestinali con filtri a membrana su terreno Slanetz Bartley Agar, seguito dalla conferma su Bile Aesculin Azide Agar.

Il triptosio e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine, aminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia, il fosfato dipotassico tampona il terreno e la sodio azide è l'agente selettivo per sopprimere la crescita dei batteri Gram-negativi. Il TTC funge da indicatore: gli enterococchi lo riducono in formazina insolubile all'interno delle cellule batteriche e crescono con colonie rosse/marroni/rosa.

4-PREPARAZIONE

Sospendere 41,5 g di in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione agitando frequentemente. Non superare il tempo e la temperatura di riscaldamento, non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a circa 47-50 °C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere
Aspetto del terreno in piastra
pH (20-25°C)

Fine granulometria omogenea, gialla
giallo con sfumature rosa, limpido o leggermente opalescente
7,2 ± 0,1

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Slanetz Bartley Agar	Terreno di coltura in polvere	4020462	500 g (12,1 L)
		4020464	5 kg (121 L)
Slanetz Bartley Agar	Piastre pronte all'uso	542046	2 x 10 piastre ø 90 mm
Slanetz Bartley Agar	Piastre pronte all'uso	492046	3 x 10 piastre ø 55 mm

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre Petri sterili, membrane filtranti, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8-CAMPIONI

Il metodo di analisi qui descritto, tratto dalla norma ISO 7899-2, è adatto all'esame dell'acqua potabile, dell'acqua delle piscine e di altre acque pulite o disinfettate. Tuttavia, il metodo può essere applicato a tutti i tipi di acqua, ad eccezione di quelle con un'elevata quantità di sostanze in sospensione o un notevole carico di microrganismi interferenti. L'applicazione del metodo appare particolarmente appropriata per l'analisi di grandi quantità di acqua contenente un basso numero di enterococchi intestinali. Per i dettagli operativi sul campionamento, fare riferimento alla norma citata^{3,4} e alle altre norme applicabili.

9-PROCEDURA DELL'ANALISI

Tecnica della filtrazione su membrana³

- Filtrare un volume adeguato di campione attraverso un filtro a membrana da 0,45 µm.
- Porre la membrana su una piastra di Slanetz Bartley Agar e incubare a 36 ± 2°C per 44 ± 4 ore.
- Dopo l'incubazione, considerare come tipiche tutte le colonie che mostrano un colore rosso, marrone o rosa.
- Se si osservano colonie tipiche, trasferire la membrana sulla superficie di una piastra di Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation (REF 401018) e incubare a 44 ± 0,5°C per 2 ore.



10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrando ogni specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie. Contare come enterococchi intestinali tutte le colonie di colore rosso-marrone o rosa su Slanetz Bartley Agar e che crescono con un alone marrone o nero su Bile Aesculin Azide Agar.

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
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	35-37°C /44-48 H-A	Buona crescita, colonie rosse
<i>E. faecium</i> ATCC 6057	35-37°C /44-48 H-A	Buona crescita, colonie rosse
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37°C /44-48 H-A	totalmente inibito
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35-37°C /44-48 H-A	totalmente inibito

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Slanetz Bartley Agar (TB) disidratato e pronto all'uso viene testato per la produttività e la selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato e con Tryptic Soy Agar (TSA).

La produttività viene testata con un metodo MF quantitativo con i seguenti ceppi target *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecalis* CIP 106877, *E. faecium* ATCC 6057, *E. faecium* CIP 106876. I filtri a membrana vengono inoculati su piastre di Slanetz Bartley Agar con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubati a 37°C per 44 ore. Le colonie vengono contate sui lotti testati e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{TB}/UFC_{TSA}). Se Pr è $\geq 0,5$ e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie rosse), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività viene valutata con il metodo della goccia superficiale di Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland dei ceppi non target *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. Dopo un'incubazione di 44* ore a 37°C, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

13-LIMITI DEL METODO

- ISO 7899-2 descrive un metodo per l'isolamento e il conteggio degli enterococchi intestinali, principalmente appartenenti alle specie *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ed *E. hirae*. Inoltre, possono essere occasionalmente rilevate altre specie riconducibili al genere *Enterococcus* e alcune specie riconducibili al genere *Streptococcus* (ad esempio, *S. bovis* e *S. equinus*). Queste specie di *Streptococcus* non sopravvivono a lungo nell'acqua ed è probabile che non sia possibile una valutazione quantitativa. Ai fini dell'analisi delle acque, gli enterococchi possono essere considerati indicatori di inquinamento fecale. Tuttavia, va notato che alcuni enterococchi trovati nell'acqua possono occasionalmente provenire da habitat diversi.³
- Nel test di conferma eseguito con trasferimento su membrana filtrante, una distribuzione non uniforme delle colonie batteriche o la presenza di elevate cariche microbiche possono interferire con la differenziazione delle colonie positive a causa della diffusione del colore alle colonie adiacenti.

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 disidratati devono essere maneggiati con una protezione adeguata. Slanetz Bartely Agar è classificato come pericoloso. 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).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e controllo qualità dei terreni preparati e della convalida della loro durata, in base al tipo e alle condizioni di conservazione (temperatura e imballaggio). Secondo ISO 7889-2, le piastre preparate possono essere conservate al buio e protette dall'evaporazione fino a 2 settimane a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.





Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare le piastre nella loro confezione originale a $+2 / +8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $+2 / +8\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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).

16- BIBLIOGRAFIA

1. Slanetz LW, Bent DF, Bartley CH. Use of the membrane filter technique to enumerate enterococci in water. Public Health Rep (1896),1955;70:67-72.
2. Slanetz LW, Bartley CH. Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. J Bacteriol 1957; 74:591-5.
3. ISO 7899-2:2000 Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method.
4. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2017.
5. Burkwall MK, Hartman PA. Comparison of direct plating media for the isolation and enumeration of enterococci in certain frozen foods. Appl Microbiol. 1964; 12:18-23.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	 Monouso
 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	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2023

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

