

SLANETZ BATLEY AGAR W/O TTC

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo e differenziale da aggiungere a TTC per il conteggio degli enterococchi in acqua e in altri materiali mediante la tecnica della filtrazione su membrana.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA *

Triptosio	20,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Glucosio	2,0 g
Potassio fosfato bibasico	4,0 g
Sodio azide	0,4 g
Agar	10,0 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 completato con TTC 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). Slanetz Bartley Agar completato con TTC, chiamato anche mEnterococcus agar o m-Azide Agar, soddisfa i requisiti ISO 7899-2³ e APHA⁴ per il conteggio degli enterococchi intestinali nell'acqua mediante la tecnica della filtrazione su membrana. Burkwall e Hartman⁵ hanno dimostrato che l'aggiunta di 0,5 mL di Tween 80 e 20 mL di una soluzione di carbonato o bicarbonato di sodio al 10% per ogni litro di terreno era utile quando si studiavano gli 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.

Slanetz Bartley Agar senza TTC è proposto per la preparazione industriale di piastre per inclusione, dove grandi volumi fanno diventare il terreno (con TTC incluso nella polvere) di colore rosso chiaro.

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, la sodio azide è l'agente selettivo per sopprimere la crescita dei batteri Gram-negativi; Il TTC funge da indicatore: gli enterococchi lo riducono a formazina insolubile all'interno delle cellule batteriche e crescono con colonie rosso/marrone/rosa.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 41,4 g di in 1000 mL di acqua depurata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente. Non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a circa 47-50 °C e aggiungere 10 mL di soluzione di TTC all'1% (REF 42111801). Mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, gialla
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	giallo, limpido o leggermente opalescente
pH finale (20-25 °C)	7,2 ± 0,1

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Slanetz Bartley Agar w/o TTC	Terreno di coltura in polvere	4020472	500 g (12,1 L)
		4020474	5 Kg (121 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre Petri sterili, filtri a membrana, TTC 1% Solution REF 42111801, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Il metodo di analisi qui descritto, tratto dalla norma ISO 7899-2, è adatto per l'esame di acqua potabile, acqua di piscine e altra acqua pulita o disinfettata. Tuttavia, il metodo può essere applicato a tutti i tipi di acqua ad eccezione di acque con un'elevata quantità di materia in sospensione o un notevole carica di microrganismi interferenti. L'applicazione del metodo appare particolarmente appropriata per l'analisi di grandi quantità di acque contenenti un basso numero di enterococchi intestinali. Fare riferimento alla norma citata^{3,4} e alle altre norme applicabili per i dettagli sul campionamento operativo.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Tecnica con membrane filtranti³

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

10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrando ogni specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Considerare come enterococchi intestinali tutte le colonie rosso-marrone o rosa su Slanetz Bartley Agar e che crescono con un alone da marrone a nero su Bile Aesculin Azide Agar.





11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore 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>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 registrato di American Type Culture Collection

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Slanetz Bartley Agar w/o TTC disidratato, addizionato con soluzione TTC (TB), 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 è 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 ed incubate 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 tipiche (colonie rosse) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche

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

13 – LIMITE 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
- 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 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 buone pratiche di fabbricazione nel processo di produzione dei terreni.
- 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 autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo ISO 7889-2, le piastre preparate possono essere conservate al buio e protette dall'evaporazione fino a 2 settimane a 5 °C \pm 3 °C.

16 - Bibliografia

- Slanetz LW, Bunt DF, Bartley CH. Use of the membrane filter technique to enumerate enterococci in water. Public Health Rep (1896), 1955;70:67-72.
- 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.





- ISO 7899-2:2000 Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method.
- APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2017.
- 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	
 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	04/2023

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

