

STAPHYLOCOCCI 110 MEDIUM

Terreno di coltura in polvere



Staphylococci 110 Medium: piastra addizionata di soluzione di ammonio solfato; *S. aureus* con colonie gelatinasi positive

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione degli stafilococchi da campioni clinici e da altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Triptone	10,0 g
Estratto di lievito	2,5 g
Gelatina	30,0 g
Lattosio	2,0 g
Mannitolo	10,0 g
Sodio cloruro	75,0 g
Potassio fosfato monobasico	5,0 g
Agar	15,0 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Staphylococci 110 Medium, noto anche come Stone Gelatin Agar, è preparato sulla base della formulazione descritta da Chapman¹ nel 1946, sviluppata a seguito delle osservazioni di Stone² del 1935 sulla positività al test della gelatinasi degli stafilococchi implicati in episodi di tossinfezione alimentare.

Staphylococci 110 Medium è un terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione degli stafilococchi, sulla base della tolleranza ad alte concentrazioni di sodio cloruro, della pigmentazione delle colonie, della fermentazione del mannitolo e della liquefazione della gelatina. Il terreno, è particolarmente indicato per studi su episodi di tossinfezioni alimentari sostenuti da stafilococchi.³ Il terreno è conforme alle formulazioni descritte da APHA⁴ ed AOAC⁵.

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 (7,5%) che permette una buona crescita degli stafilococchi patogeni ed una inibizione da parziale a totale dei batteri Gram negativi e degli enterococchi. Il lattosio promuove la crescita batterica; il mannitolo è inserito nel terreno come carboidrato fermentabile: *S. aureus* fermenta il mannitolo 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 mannitolo. La gelatina consente di evidenziare le proprietà gelatinolitiche degli stafilococchi: il terreno, dopo aggiunta di una soluzione satura di ammonio solfato, assume 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 ottenendosi un alone di chiarificazione per l'assenza dei suddetti precipitati.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 149 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, beige
Aspetto del terreno in soluzione	beige, opalescente con precipitato
Aspetto del terreno in piastra	beige, opalescente
pH (20-25°C)	7,0 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Staphylococci 110 Medium	Terreno di coltura in polvere	4020852	500 g (3,3 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

Il terreno è destinato al trattamento batteriologico di campioni alimentari. Per la raccolta e la preparazione dei campioni, fare riferimento agli standard internazionali applicabili. 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.

Ruotare il tampone con il quale è stato raccolto il campione su un'area ristretta della piastra, quindi strisciare su quattro quadranti della piastra per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. Incubare a 35°C per 43 ore o a 30°C per 48 ore, in aerobiosi. L'incubazione a





30° C favorisce lo sviluppo della pigmentazione giallo-arancio degli stafilococchi patogeni senza interferire nelle reazioni della gelatinasi e della fermentazione del mannitolo.³

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 l'osservazione della pigmentazione delle colonie, con la lettura dei test della fermentazione del mannitolo e di liquefazione della gelatina (gelatinasi).

Pigmentazione: osservare il colore delle colonie che può variare da bianco (*S.epidermidis*) a giallo-oro/arancio (stafilococchi patogeni).

Fermentazione del mannitolo: rimuovere la colonia sospetta 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 mannitolo

Gelatinasi: distribuire sulla superficie del terreno circa 5 mL di soluzione satura di ammonio solfato preriscaldata alla temperatura del terreno e incubare a 37°C per 10 minuti. La gelatina, in presenza dell'ammonio solfato forma un precipitato lattescente; l'osservazione di un alone trasparente di chiarificazione attorno alle colonie o alle aree delle colonie rimosse indica l'avvenuta idrolisi della gelatina.

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

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

Confermare l'identificazione presuntiva di *S.aureus* con test addizionali, come la coagulasi: prelevare con una ansa la colonia 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 colonia da agar-sangue con 0,5 mL di plasma di coniglio (Coagulase Plasma EDTA cat. n. 429937).ed incubare a 35-37°C.

Osservare ogni ora nelle prime 4 ore di incubazione per la coagulazione inclinando delicatamente la provetta. Non agitare.

Se entro 4 ore non si osservano coaguli, rileggere la provetta dopo 18-24 ore di incubazione a 35-37°C.

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 gialle con alone trasparente, mannitolo positive
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	30-35°C / 44-48 H / A	crescita, colonie bianche con alone trasparente, mannitolo 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 Staphylococchi 110 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 48 ore, con 2 ceppi target ATCC (*S.aureus* ATCC 25923 e *S.aureus* ATCC 6538) e con 1 ceppi di *S.aureus* di isolamento alimentare. Le colonie di *S.aureus* appaiono giallastre circondate da una zona di chiarificazione del terreno e sono positive al test della fermentazione del mannitolo, 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 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 mannitolo, 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 35°C per 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 mannitolo; le colonie sono comunque minuscole e sono facilmente differenziabili con la colorazione Gram e con il test della catalasi; enterococchi: cocchi in catenelle lunghe o corte, catalasi negativi, stafilococchi: cocchi a grappoli, catalasi positivi.³
- Nell'isolamento primario dal campione *S.aureus* può produrre una pigmentazione delle colonie giallo-oro/arancio; esse tuttavia possono anche essere bianche o incolori. La temperatura ottimale per la produzione dei pigmenti è leggermente più bassa (25-30°C) di quella ottimale per la crescita. Tuttavia la pigmentazione delle colonie non è un criterio affidabile per la differenziazione delle specie del genere *Staphylococcus*.³
- 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 e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è adatto ad un uso di tipo qualitativo, 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.

- 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.
- 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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Chapman, G.H. (1946). J. Bacteriol. 51:409.
2. Stone R. V. (1935) Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 33. 185-187.
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. American Public Health Association (1978) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA Inc. Washington DC.
5. Association of Official Analytical Chemists (1992) Bacteriological Analytical Manual. 7th Edn. AOAC. Washington DC.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2022

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

