

OGYE AGAR BASE OXYTETRACYCLINE ANTIMICROBIC SUPPLEMENT GENTAMICIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplementi selettivi

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'individuazione e il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti

2 – COMPOSIZIONE *

OGYE AGAR BASE

FORMULA TIPICA (DOPO RICOSTITUZIONE CON 1 L DI ACQUA)

Estratto di lievito	5,0 g
Glucosio	20,0 g
Agar	13,0 g

OXYTETRACYCLINE ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Ossitetraciclina HCl	50 mg
----------------------	-------

GENTAMICIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Gentamicina solfato	25 mg
---------------------	-------

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Tradizionalmente, i terreni acidificati sono stati utilizzati per il conteggio di lieviti e muffe e possono essere appropriati per alcuni tipi di alimenti. Tuttavia, i terreni integrati con antibiotici sono più comunemente utilizzati in quanto possono facilitare la rivitalizzazione delle cellule danneggiate.¹

Mossel *et al.*² nel 1962 hanno dimostrato che i terreni acidi non sono del tutto adatti alla conta di lieviti e muffe negli alimenti per due motivi: 1) le cellule di lievito stressate dal calore non tollerano le condizioni acide necessarie per inibire i contaminanti batterici; 2) la crescita di lieviti e muffe è spesso limitata dalla presenza di una flora batterica tollerante agli acidi. Mossel *et al.*³ hanno descritto l'Oxytetracycline-Glucose Yeast Extract (OGYE o OGY) Agar per l'isolamento selettivo e il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti e hanno dimostrato che questo terreno migliora il recupero dei funghi rispetto ai terreni agarizzati acidificati.

In determinate condizioni sperimentali e durante l'analisi di alcuni alimenti, l'uso della sola ossitetraciclina non era sufficiente per ottenere conteggi affidabili di lieviti e muffe.⁴ Mossel *et al.*⁵ hanno osservato che, nel caso di alimenti ad alto contenuto proteico, fortemente contaminati da bastoncini Gram-negativi, era necessario utilizzare sia l'ossitetraciclina che la gentamicina per ottenere un'inibizione completa dei contaminanti.

OGYE Agar contiene estratti di lievito che forniscono vitamine del complesso B per stimolare la crescita batterica. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il cloramfenicolo e la gentamicina sono inibitori di un'ampia gamma di batteri Gram-negativi e Gram-positivi.

4 - PREPARAZIONE

A) OXYTETRACYCLINE GLUCOSE YEAST EXTRACT AGAR

Sospendere 19 g in 500 mL di acqua fredda purificata e riscaldare fino all'ebollizione per dissolverlo completamente. Autoclavare a 115°C per 15 minuti e raffreddare rapidamente a circa 47-50°C. Ricostituire in condizioni asettiche una fiala di Oxytetracycline Antimicrobial Supplement (codice 4240000) con 5 mL di acqua purificata sterile e aggiungere al terreno di coltura. Concentrazione finale di ossitetraciclina HCl: 100 mg/L.

B) OXYTETRACYCLINE GENTAMICIN GLUCOSE YEAST EXTRACT AGAR

Preparare il terreno come descritto sopra e aggiungere il contenuto di una fiala di Gentamicin Antimicrobial Supplement (codice 4240004), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Concentrazioni finali: gentamicina 50 mg/L, ossitetraciclina 100 mg/L

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno disidratato	giallastro, polvere fine, omogenea
Aspetto della soluzione e della piastre preparate	giallo, limpido
Oxytetracycline Antimicrobial Supplement	pastiglia bassa, compatta, giallo pallido; soluzione limpida giallo pallido dopo ricostituzione
Gentamicin Antimicrobial Supplement	pastiglia bassa, compatta, bianca; soluzione limpida incolore dopo ricostituzione
pH finale a 20-25 °C	6,6 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
OGYE Agar Base	Terreno in polvere	4018382	500 g (13,1 L)
Oxytetracycline Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilo	4240000	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Gentamicin Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilo	4240004	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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





8 – CAMPIONI

Campioni alimentari. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Per il conteggio di lieviti e muffe, si raccomanda il seguente schema di terreni di coltura:

- OGYE Agar Base + ossitetraciclina: uso generale su alimenti con basso contenuto proteico e scarsa contaminazione da bacilli Gram negativi.
- OGYE Agar Base + ossitetraciclina e gentamicina: alimenti ad alto contenuto proteico in cui lieviti e muffe sono associati a bacilli Gram negativi.

1. Preparare una serie di diluizioni adeguate del campione.
2. Trasferire 1 mL di ogni diluizione del campione in una piastra Petri sterile vuota da 9 cm (2 piastre per diluizione).
3. Aggiungere a ciascuna piastra circa 15 mL di terreno fuso e raffreddato preparato come descritto sopra. Mescolare delicatamente girando le piastre.
4. Incubare tra 22 °C e 25 °C per 5 giorni, ma non oltre.

Le piastre possono essere inoculate anche con la tecnica della semina superficiale.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Contare le colonie in piastre contenenti 50-100 colonie dopo 5 giorni o in qualsiasi piastra contabile quando i miceli aerei sembrano oscurare successive letture dopo 2 giorni.

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 facoltà 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>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	25 ± 1°C / 5 giorni / A	crescita
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	25 ± 1°C / 5 giorni / A	crescita
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25 ± 1°C / 5 giorni / A	inibito
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25 ± 1°C / 5 giorni / A	inibito

A: incubazione aerobica; 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 OGYE Agar Base disidratato integrato con Oxytetracycline Antimicrobic Supplement (REF 4240000) viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con un test quantitativo, con i ceppi target *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. albicans* ATCC 10231, *A. brasiliensis* ATCC 16404, *P. cyclopium* ATCC 16025; le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 25° C per 3-5 giorni in areobiosi. Le colonie vengono contate sul lotto di prova (TB) e sul lotto di riferimento (RB) e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr:UFC_{TB}/UFC_{RB}). Se Pr è ≥ 0,7 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività viene valutata con il metodo modificato Miles-Misra, inoculando la superficiale delle piastre con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland dei seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633. La crescita del ceppo non target è totalmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- OGYE Agar perde le sue proprietà batteriostatiche, soprattutto nei confronti di *Bacillus* spp. quando il terreno viene inoculato abbondantemente, quando l'incubazione viene prolungata, o la temperatura viene aumentata a 35-37°C, o quando viene esposto a substrati proteici.⁶
- Le muffe non crescono su OGYE Agar quando la contaminazione è bassa.⁶
- La crescita rapida di alcune muffe può mascherare colonie di organismi a crescita lenta.⁶
- Il terreno non è adatto alla coltivazione di spore di *Byssoschlamys* spp. Per questo genere si raccomanda un terreno contenente cloramfenicolo.⁶
- Le spore delle muffe si disperdono nell'aria con grande facilità, maneggiare le piastre Petri con cura per evitare lo sviluppo di colonie satelliti che causerebbero una sovrastima della popolazione nel campione.⁷
- I metodi di conteggio dei lieviti e soprattutto delle muffe sono imprecisi perché sono costituiti da una miscela di micelio e spore asessuate e sessuate. Il numero di unità formanti colonie dipende dal grado di frammentazione del micelio e dalla proporzione di spore in grado di crescere sul terreno di coltura.⁷
- Spesso si verifica una non linearità dei conteggi da diluizione a piastra, vale a dire che una diluizione di 10 volte del campione spesso non si traduce in riduzioni di 10 volte del numero di colonie recuperate sui terreni di coltura. Ciò è stato attribuito alla frammentazione dei miceli e alla rottura degli ammassi di spore durante la diluizione, oltre che all'inibizione competitiva quando un gran numero di colonie è presente sulle piastre.⁷
- Si raccomanda di eseguire test di identificazione sugli isolati provenienti da colture pure

14 – PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed i supplementi qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.





- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Oxytetracycline Antimicrobic Supplement e Gentamicin Antimicrobic Supplement sono classificati come pericoloso secondo la normativa vigente. 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- I supplementi sono sterilizzati mediante filtrazione su membrana.
- 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

Terreno di coltura in polvere

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).

Supplemento liofilizzato

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

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 MacFaddin, OGYE Agar Base senza antibiotici può essere conservato a 2-8°C al buio per un massimo di 6 mesi, mentre il terreno addizionato con antibiotici deve essere utilizzato immediatamente.

16- BIBLIOGRAFIA

1. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.
2. Mossel DAA, Visser M, Mengerink WHJ. A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in foods and beverages, Lab Pract 1962; 11:109.
3. Mossel DAA, Kleynen-Semmeling AM, Vincentie HM, Beerens H, Catsaras M. Oxytetracycline-glucose-yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. J Appl Bacteriol 1970; 33:454-7.
4. Put HM The limitation of oxytetracycline as a selective agent in media for the enumeration of fungi in soil, feeds and foods in comparison with the selectivity obtained by globenicol (chloramphenicol). Arch. Lebensmittel Hyg. 1974; 25:73.
5. Mossel DAA, Vega CL, Put HM. Further studies on the suitability of various media containing antibacterial antibiotics for the enumeration of moulds in food and food environments J Appl Bacteriol 1975; 39:15-22.
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	or REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Fabbricante	Utilizzare entro	Proteggere dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce		

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 7	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

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

