



BILE AESCULIN AZIDE AGAR ISO FORMULATION

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso



Colonie di *E. faecalis* cresciute su membrana filtrante posta su Slanetz Bartley Agar (a sinistra), trasferita su BEEA-ISO e incubata per 2 ore (a destra).

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo e differenziale per il test di conferma delle colonie di enterococchi in accordo alla norma ISO 7899-2.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Triptone	17,00 g
Peptone	3,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Bile di bue	10,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Esculina	1,00 g
Ferro Ammonio Citrato	0,50 g
Sodio Azide	0,15 g
Agar	13,00 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nel 1924, Rochaix¹ applicò il test dell'esculina per la differenziazione degli enterococchi dagli altri streptococchi. Utilizzando la base dell'esculina, Meyer e Schonfeld², nel 1926 aggiunsero la bile: nel loro studio scoprirono che gli enterococchi erano in grado di crescere e scindere l'esculina, mentre altri streptococchi non potevano. Isenberg, Goldberg e Sampson ridussero la concentrazione della bile e aggiunsero la sodio azide.³

Bile Aesculin Azide Agar è preparato secondo la formulazione descritta dalla ISO 7899-2 per il test di conferma delle colonie di enterococchi isolate dall'acqua, in base alla loro capacità di crescere e idrolizzare il glicoside esculina.⁴ Il metodo descritto nella ISO 7899-2 prevede l'enumerazione di enterococchi intestinali con membrana filtrante su terreno Slanetz Bartley Agar, seguito da conferma su Bile Aesculin Azide Agar.

Triptone, peptone ed estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, aminoacidi, vitamine del gruppo B e oligoelementi per la crescita microbica; i sali biliari sono agenti selettivi che limitano la crescita di batteri Gram-positivi diversi dagli enterococchi mentre la sodio azide inibisce la crescita di batteri Gram-negativi; l'esculina viene idrolizzata dagli enterococchi a glucosio ed esculetina (6-7diidrossicumarina): l'esculetina reagisce con il citrato ferrico per formare un complesso marrone scuro o nero.⁵ Rispetto alla formulazione classica di Isenberg, il terreno ISO contiene meno sodio azide e nessun citrato di sodio.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 57,4 g of in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto frequente agitazione e sterilizzare in autoclave a 151°C per 15 minuti. Non eccedere nel tempo e nella temperatura di sterilizzazione. Raffreddare a circa 47-50 °C e trasferire in capsule di Petri sterili in modo da ottenere uno strato tra 3mm e 5 mm.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	tannino con riflessi azzurri, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,1 ± 0,1

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation	Terreno di coltura in polvere	4010182	500 g (9 L)
Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation	Piastre pronte all'uso	541018	2 x 10 piastre ø 90 mm
Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation	Piastre pronte all'uso	491018	3 x 10 piastre ø 55 mm

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, anse sterili, incubatore e altra attrezzatura di laboratorio, beute Erlenmeyer, capsule di Petri sterili, reagenti e terreni di coltura accessori per completare l'identificazione dei ceppi isolati.

8 – CAMPIONI

Il metodo di analisi qui descritto è adatto per l'esame di acqua potabile, acqua di piscine e altre acque pulite o disinfettate. Tuttavia, il metodo può essere applicato a tutti i tipi di acqua ad eccezione dell'acqua con un'elevata quantità di sostanze sospese o un notevole carico di microrganismi interferenti. L'applicazione del metodo appare particolarmente appropriata per l'analisi di grandi quantità di acqua contenenti un basso numero di enterococchi intestinali. Riferirsi alla norma citata⁴ e ad altre norme applicabili per i dettagli operativi del campionamento.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Metodo delle membrane filtranti⁴

Filtrare un volume adeguato di campione attraverso una membrana da 0,45 µm. Posizionare 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 mostrino una colorazione rossa, marrone o rosa. Nel caso si osservino colonie tipiche, trasferire la membrana sulla superficie di una piastra di Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation e incubare a 44 ± 0,5°C per 2 ore.





Tecnica MPN⁵

1. Inoculare una serie di provette di Azide Dextrose Broth (REF 401105) con adeguate diluizioni di un campione da 100 mL. Usare volumi di campione di 10 mL o meno. La forza del brodo sarà proporzionale alla dimensione del campione.
2. Incubare a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore e osservare la crescita microbica (torbidità del brodo); se non si osserva torbidità, continuare l'incubazione per altre 24 ore.
3. Strisciare una aliquota da ciascuna provetta positiva su Bile Aesculin Azide Agar ISO Form. e incubare a 35°C per 24 ± 2 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo incubazione, osservare la crescita batterica e registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie. Contare come enterococchi intestinali tutte le colonie con un alone da bruno a nero, che in precedenza su Slatetz Bartley Agar avevano dato crescite rosse-marroni o rosa.

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 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.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	44°C / 2 H-A	buona crescita, colonie con alone nero
<i>E. faecium</i> ATCC 27270	44°C / 2 H-A	buona crescita, colonie con alone nero

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti del terreno in polvere e pronto all'uso Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato.

La produttività è testata con un metodo semi-quantitativo su membrane filtranti deposte su piastre di Slatetz Bartley, incubate e poi trasferite sulla superficie di piastre di Bile Aesculin Azide Agar ISO Formulation, con i seguenti ceppi target: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecium* ATCC 27270, *E. faecium* ATCC 6067. Dopo incubazione a 44°C per 2 ore i ceppi target mostrano annerimento del terreno intorno alle colonie.

13 – LIMITI DEL METODO

- La ISO 7899 descrive un metodo per l'isolamento e la conta degli enterococchi intestinali, principalmente appartenenti alle specie *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ed *E. hirae*. Occasionalmente possono essere rilevate anche altre specie riferibili al genere *Enterococcus* e alcune specie riferibili al genere *Streptococcus* (es. *S. bovis* e *S. equinus*). Queste specie di *Streptococcus* non sopravvivono a lungo in acqua ed è probabile che una valutazione quantitativa non sia possibile. Ai fini dell'analisi dell'acqua, gli enterococchi possono essere considerati indicatori di inquinamento fecale. Tuttavia, va notato che alcuni enterococchi presenti nell'acqua possono anche provenire occasionalmente da habitat diversi.⁴
- Nel test di conferma eseguito con trasferimento su membrana filtrante, una distribuzione non uniforme delle colonie batteriche o la presenza di elevate cariche microbiche può interferire con la differenziazione delle colonie positive a causa della diffusione del colore nelle 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.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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

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'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). In accordo alla ISO 7889-2, i terreni pronti in piastre devono essere conservati al buio per 2 settimane 5 °C ± 3 °C.

Piastre pronte

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. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Rochaix, A. Milieux a l'esculine pour le diagnostic differential des bacteries du groups strepto-enteropneumocoque. C R Soc Biol. 1924; 90:771-772.
2. Meyer K, Schonfeld H. Uber die Unterscheidung des Enterococcus vom Streptococcus viridans and die Beziehung beider zum Streptococcus lactis. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig. 1926; 99:402-416.
3. Isenberg HFD, Goldberg D, Sampson J. Laboratory studies with a selective Enterococcus medium. Appl Microbiol.1970 Sep;20(3):433-6.
4. ISO 7889-2:2000 Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method
5. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23rd ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	2022/08

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

