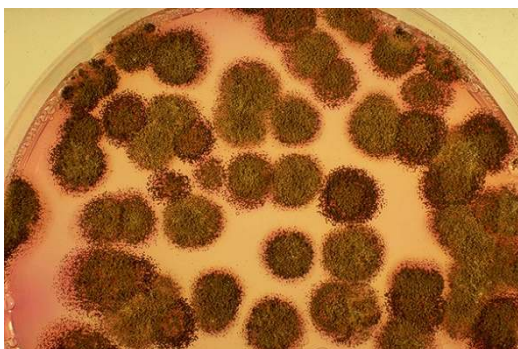




ROSE BENGAL AGAR WITH CHLORAMPHENICOL

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso



Rose Bengal Chloramphenicol Agar:
Colonie di *Aspergillus brasiliensis*

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio di lieviti e muffe in alimenti e mangimi.

2 – COMPOSIZIONE *

TERRENO IN POLVERE E PIASTRE PRONTE ALL'USO

Peptone micologico	5,00 g
Potassio fosfato bibasico	1,00 g
Magnesio solfato	0,50 g
Glucosio	10,00 g
Rosa bengala	0,05 g
Agar	15,00 g
Cloramfenicolo	0,10 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Rose Bengal Chloramphenicol Agar si basa sulla formulazione ideata da Jarvis¹ e modificata da Overcast e Weakley², in cui la clortetraciclina è stata sostituita dal cloramfenicolo. È un terreno selettivo a pH neutro per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti ed è consigliato per alimenti proteici freschi la cui flora associata è composta principalmente da bacilli Gram-negativi.³

Il peptone micologico fornisce azoto e minerali per la crescita microbica e la pigmentazione delle colonie. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il fosfato dipotassico viene utilizzato come agente tampone per controllare il pH nel terreno. Il solfato di magnesio migliora la crescita microbica. Il rosa bengala non solo limita le dimensioni e l'altezza delle colonie di muffe, ma aiuta il conteggio in quanto il colore viene assorbito dai funghi. Il cloramfenicolo è usato come agente selettivo per sopprimere la maggior parte dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 32 g in 1000 mL di acqua distillata fredda e portare ad ebollizione per scioglierli completamente. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti e raffreddare a 47-50°C. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, rosa
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	rosa brillante, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,2 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rose Bengal Agar with Chloramphenicol	Terreno in polvere	4019922	500 g (15.6 L)
Rose Bengal CAF Agar	Piastre pronte all'uso	541991C	2 x 10 plates ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari per l'identificazione delle colonie.

8 – CAMPIONI

Alimenti e mangimi per animali. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare adeguate diluizioni decimali dei campioni.

Aggiungere 1 mL a piastre Petri vuote utilizzando due piastre per ogni diluizione. Versare in ogni piastra circa 15 mL di terreno sciolto e raffreddato a 44-47°C. Mescolare delicatamente, permettendo al terreno di gelificare.

In alternativa, inoculare direttamente le piastre di agar utilizzando la tecnica di diffusione superficiale con 0,1 o 0,2 mL di diluizioni decimali.

Capovolgere le piastre e incubare a 22°C per 5 giorni.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie isolate.

Contare le colonie su piastre che contengono circa 50-100 colonie. Riportare il numero di lieviti o muffe per grammo di alimento moltiplicando il numero di colonie per il fattore di diluizione.

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>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	25°C/72h/A	crescita
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	25°C/72h/A	crescita con limitata diffusione delle colonie
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25°C/72h/A	inibito

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Rose Bengal Chloramphenicol Agar disidratato viene testato per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento.

La produttività è testata con metodo ecometrico semiquantitativo con i ceppi target *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. albicans* ATCC 18804, *P. chrysogenum* ATCC 10106, *A. brasiliensis* ATCC 9642; le piastre vengono inoculate mediante tecnica di diffusione in superficie con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 25 °C per 72 ore in aria. I ceppi target mostrano una buona crescita con colonie tipiche e diffusione limitata delle colonie.

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 seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853. La crescita di *E. coli* e *S. aureus* è totalmente inibita mentre *P. aeruginosa* è parzialmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- 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 darebbero una sovrastima della popolazione nel campione.⁴
- I metodi di conteggio dei lieviti e soprattutto delle muffe sono imprecisi perché essi sono costituiti da una miscela di micelio e spore asessuate e sessuali. Il numero di unità formanti colonie dipende dal grado di frammentazione del micelio e dalla proporzione di spore in grado di crescere sul terreno mediante semina diretta in piastra.⁴
- Si verifica spesso una non linearità dei conteggi dalla semina per diluizione, ovvero diluizioni di 10 volte dei campioni spesso non determinano riduzioni di 10 volte del numero di colonie recuperate sui terreni di coltura. Ciò è stato attribuito alla frammentazione del micelio e alla rottura dei grumi di spore durante la diluizione oltre all'inibizione competitiva quando sulle piastre è presente un gran numero di colonie.⁴
- Per una completa identificazione dei microrganismi isolati, si raccomanda di eseguire test appropriati utilizzando colture pure.

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).

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).

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). Secondo Baird *et al.* le piastre preparate autonomamente possono essere conservate al buio a 2-8°C per 7 giorni.⁵



**16 - BIBLIOGRAFIA**

1. Jarvis B. Comparison of an improved rose-bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food. J Appl Bacteriol 1973; 36: 723-727.
2. Overcast WW, Weakley DJ. An aureomycin-rose Bengal agar for the enumeration of yeasts and moulds in cottage cheese. J Milk Food Technol 1969; 32:442.
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. 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.
5. Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Proceedings of the 4th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Manchester 4-5 September, 1986. Int J Food Microbiol 1987; 5:261-262.

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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2023
Revisione 4	Aggiornamento paragrafo preparazione	02/2024

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

