

R2A AGAR

Terreno in polvere, provette e flaconi pronti all'uso.

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio in piastra dei batteri eterotrofi nei campioni d'acqua

2- COMPOSIZIONE*

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)

TERRENO IN POLVERE E PRONTO ALL'USO

Estratto di lievito	0,50 g
Peptone proteose	0,50 g
Idrolizzato acido di caseina	0,50 g
Glucosio	0,50 g
Amido solubile	0,50 g
Di potassio fosfato	0,30 g
Sodio piruvato	0,30 g
Agar	14,00 g
Magnesio solfato anidro	0,024 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

R2A Agar è stato ideato da Reasoner e Geldreich¹ per la conta batteriologica su piastra di acqua potabile trattata. I risultati del loro studio con procedure di diffusione, filtraggio su membrana e conta in inclusione, hanno dimostrato che il terreno R2A ha prodotto conteggi batterici significativamente più elevati rispetto ai conteggi in superficie e che un tempo di incubazione più lungo, fino a 14 giorni, a 20°C, ha prodotto conteggi più elevati e un maggiore rilevamento di batteri pigmentati¹.

Questo agar a basso contenuto di nutrienti e con una temperatura di incubazione più lunga può migliorare il recupero di batteri stressati e tolleranti al cloro.²

La formulazione del terreno si basa sul principio che molti batteri, che vivono in acque naturali con nutrienti limitati e a temperature prossime a quella ambiente, crescono meglio su terreni di coltura con concentrazioni ridotte di peptone a temperatura ambiente.

R2A Agar è raccomandato dalla Farmacoepa Europea per la determinazione della conta microbica totale dell'acqua, dell'acqua depurata e dei serbatoi.³

R2A Agar è incluso nei metodi APHA per la conta degli eterofili con i metodi di semina per inclusione, per diffusione e metodo di filtraggio su membrana, nelle acque trattate ad uso potabile.²

Il peptone proteico e l'idrolizzato acido di caseina forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare quelle del gruppo B. Il glucosio è una fonte di carbonio. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il di potassio fosfato è utilizzato come tampone per controllare il pH del terreno di coltura. Il piruvato di sodio e l'amido aiutano a rigenerare le cellule stressate. Gli ioni di magnesio favoriscono la crescita microbica.

4A- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 17,12 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per dissolverlo completamente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

4B- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONI CODICE 5111162

Sciogliere il contenuto della beuta/provetta in un'autoclave a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ o in un bagno d'acqua a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone o la provetta possono essere inseriti in un contenitore contenente acqua, che viene posto su una piastra calda e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento per consentire lo scambio di pressione. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno di coltura in piastre Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	beige chiaro, limpido.
pH (20-25°C)	$7,2 \pm 0,2$

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
R2A Agar	Terreno di coltura in polvere	4019962	500 g (29 L)
R2A Agar	Terreno pronto all'uso in provetta	551996Q	20 x 15 mL
R2A Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5119963	6 x 200 mL

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

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

8 - CAMPIONI

Campioni di acqua: acqua potabile trattata, acqua iniettabile, acqua depurata e in serbatoi. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.^{2,3}





9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Conteggio delle colonie mediante la tecnica della semina per inclusione (acqua trattata).²

1. Utilizzando una pipetta sterile, dispensare da 0,1 a 1 mL del campione di prova liquido in una piastra Petri vuota e mescolare con R2A Agar fuso pre-raffreddato a 44-46°C.
2. Preparare le altre piastre nello stesso modo utilizzando diluizioni decimali del campione in esame.
3. Incubare le piastre in condizioni aerobiche a 20-28°C per 5-7 giorni.

Conta delle colonie con la tecnica della semina in superficie (acqua trattata).²

1. Lasciar asciugare le piastre preparate prima dell'uso.
2. Con una pipetta sterile, trasferire da 0,1 a 0,5 mL del campione da analizzare al centro di una piastra R2A Agar.
3. Spargere con cura l'inoculo in modo uniforme e il più rapidamente possibile sulla superficie della piastra di agar, senza toccare le pareti della piastra.
4. Lasciare le piastre con i coperchi per circa 15 minuti a temperatura ambiente affinché l'inoculo venga assorbito dall'agar.
5. Incubare le piastre in condizioni aerobiche a 20-28°C per 5-7 giorni.

Consultare lo standard internazionale appropriato per i dettagli delle procedure.¹⁻⁷

Metodo della semina per filtrazione su membrana (acqua farmaceutica e acqua trattata)^{2,3}

Questo metodo può essere utilizzato per analizzare grandi volumi di acqua a bassa torbidità ed è il metodo prescelto per i campioni con un basso numero di organismi eterotrofi (<1 a 10 UFC/mL).²

1. Filtrare un volume adeguato di acqua (ad es. 200 mL) attraverso una membrana ($\leq 0,45\mu\text{m}$). La dimensione del campione deve essere scelta in relazione al risultato atteso.
2. Asetticamente, posizionare il filtro a membrana sulla superficie dell'agar, in modo da evitare la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie dell'agar.
3. Incubare le piastre in condizioni aerobiche per 5 giorni a 30-35 °C 3 o a 20-28 °C per 5-7 giorni².

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, contare tutte le colonie ottenute in piastre contenenti meno di 300 colonie (nei casi della semina per inclusione o superficiale) o 200 colonie (MF) e calcolare il numero di microrganismi per millilitro del campione in esame.

Seguire le procedure raccomandate per il conteggio delle colonie e la refertazione dei risultati.^{2,3}

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore finale 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.³

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	30-35°C/3 giorni-A	buona crescita
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	30-35°C/3 giorni-A	buona crescita

A: incubazione aerobica; 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 R2A Agar disidratato e pronto all'uso (Lotto di prova: TB) viene testato per la produttività confrontando i risultati con un Lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività viene testata con un metodo quantitativo con la tecnica della semina per inclusione con i seguenti ceppi *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *A. hydrophila* ATCC 7966, *E. faecalis* ATCC 29212 e con la tecnica della tecnica su filtro a membrana con i seguenti ceppi: *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *B. subtilis* ATCC 6633. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 30-35°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: $\text{UFC}_{\text{TB}}/\text{UFC}_{\text{RB}}$). Se Pr è $\geq 0,7$ i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

13- LIMITI DEL METODO

- Un ritardo di oltre 10 minuti tra la dispensazione del campione nelle piastre di Petri e l'aggiunta di agar può determinare conteggi sottostimati.^{4,5}
- Aumentando il tempo di permanenza delle diluizioni nel diluente si ottengono conteggi sovrastimati.^{4,6}
- La conta aerobica su piastra non distingue tra diversi tipi di batteri. L'alterazione del tempo di incubazione, della temperatura e del tipo di atmosfera cambiano i tipi di organismi che crescono e che vengono contati.⁴

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura qui descritto è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno disidratato ed i pronti all'uso devono essere maneggiati con adeguate protezioni. 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.





- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- Le provette ed i flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni provetta e flacone di questo terreno di coltura è monouso.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente 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

Provette e Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

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).

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 le procedure APHA, le piastre autopreparate possono essere conservate in sacchetti di plastica sigillati a +2 °C - +8 °C per un massimo di 2 settimane.⁴

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Environ Microbiol. 1985 Jan; 49: 1-7.
2. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water, 23rd ed. 2017. APHA, Washington, DC.
3. European Pharmacopoeia 11th Edition, 2022, Vol. III.
4. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed. 2015. APHA, Washington, DC.
5. Berry JM, McNeill DA, Witter LD. Effect of delay in pour plating on bacterial counts. J Dairy Sci 1969; 52:1456-1457
6. Huhtanen CN, Brazis AR, Arledge WL et al. Effects of time of holding dilutions on counts of bacteria from raw milk. J Milk Food Technol. 1972; 35:126-130.

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	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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

