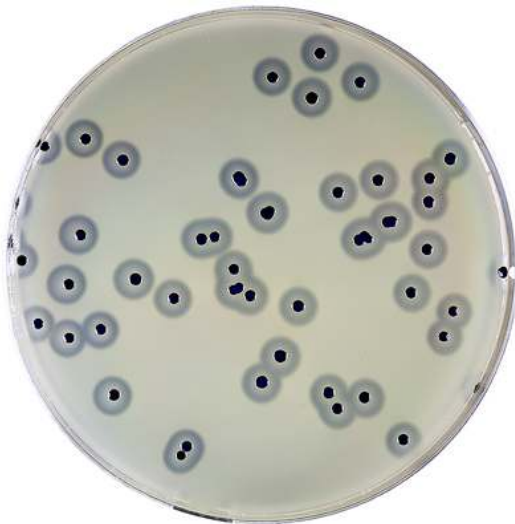




BAIRD PARKER AGAR BASE BAIRD PARKER EGG YOLK TELLURITE AGAR BAIRD PARKER RPF AGAR

Terreno in polvere e terreni pronti in piastra



Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar: colonie di *S. aureus* dopo incubazione a 37°C per 48 ore. Doppia zona attorno alle colonie, opaca all'interno, trasparente



Baird Parker RPF Agar: colonie di *S. aureus* dopo incubazione a 37°C per 48 ore (zona opaca attorno alle colonie) e di *S. epidermidis* (prive di alone)

DESTINAZIONE D'USO

Il terreno Baird Parker Agar Base, addizionato con i supplementi Egg Yolk Tellurite Emulsion o RPF Supplement, è impiegato per la conta degli stafilococchi coagulasi-positivi nei prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione animale ed in altri campioni.

FORMULE TIPICHE *

Baird Parker Agar Base (terreno in polvere)

per litro, dopo scioglimento in acqua

Triptone	10 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	1 g
Sodio piruvato	10 g
Glicina	12 g
Litio cloruro	5 g
Agar	15 g

Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar (piastre pronte)

Triptone	10 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	1 g
Sodio piruvato	10 g
Glicina	12 g
Litio cloruro	5 g
Agar	15 g
Emulsione d'uovo	50 mL
Potassio tellurito 1%	10 mL
Acqua purificata	1000 mL

Baird Parker RPF Agar (piastre pronte)

Triptone	10 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	1 g
Sodio piruvato	10 g
Glicina	12 g
Litio cloruro	5 g
Agar	15 g
Fibrinogeno	3,8 g
Inibitore della tripsina	25 mg
Plasma di coniglio (EDTA)	25 ml
Potassio tellurito	25 mg
Acqua distillata	975 ml

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

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Gli stafilococchi sono cocci anaerobi facoltativi, di forma sferica (0,5-1 µm di diametro), Gram-positivi, immobili, generalmente privi di capsula, asporigeni, anaerobi facoltativi, generalmente catalasi positivi, chemorganotrofi. Gli stafilococchi fanno parte della normale flora batterica della pelle, delle mucose e dei tratti alimentari e urogenitali di un'ampia varietà di mammiferi e di uccelli. Oltre a costituire parte della normale flora, alcune specie di stafilococchi, possono causare un'ampia varietà di processi infettivi, solitamente piogenici, in varie parti del corpo, negli animali e nell'uomo. Gli stafilococchi coagulasi positivi, soprattutto *S. aureus*, attraverso la produzione di enterotossine, inducono una gastroenterite conseguente al consumo di cibi contaminati.

Baird Parker Agar Base è un terreno selettivo di base per l'isolamento degli stafilococchi coagulasi positivi dagli alimenti e mangimi ed altri campioni; addizionato di Egg Yolk Tellurite Emulsion risulta conforme alla formulazione indicata da ISO 6888-1 ed addizionato di RPF corrisponde al terreno raccomandato da ISO 6888-2. Entrambi i terreni sono indicati dalla norma ISO 6888-3 per la determinazione con metodo MPN degli stafilococchi coagulasi positivi presenti in cariche basse nei campioni, previo arricchimento in Giolitti e Cantoni Broth.



Litio cloruro e potassio tellurito sono inibenti per la flora contaminante, glicina e sodio piruvato facilitano lo sviluppo degli stafilococchi. La riduzione del tellurito a tellurio (nero) e la chiarificazione del giallo d'uovo permettono l'identificazione presuntiva delle colonie su Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar. La formazione di un alone opaco dovuto alla coagulazione del plasma di coniglio su Baird Parker RPF Agar consente l'identificazione definitiva degli stafilococchi coagulasi positivi.

PREPARAZIONE

Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar: sospendere 58 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare in bagnomaria termoregolato a circa 47 °C-50 °C ed aggiungere, con le cautele dell'asepsi, 50 mL di Egg Yolk Tellurite Emulsion 20% (REF 423701), preriscaldata a circa 47-50 °C. Mescolare accuratamente e versare in piastre di Petri sterili: il terreno deve apparire uniformemente opaco. Prima dell'uso, essiccare le piastre, preferibilmente prive di coperchi e con la superficie dello strato di agar rivolta verso il basso, in stufa, impostando la temperatura tra 25 °C e 50 °C, sino a quando le goccioline presenti sulla superficie del terreno di coltura non siano scomparse.

Baird Parker RPF Agar: sospendere 58 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in flaconi in ragione di 90 mL per flacone ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare in bagnomaria termoregolato a circa 47-50 °C ed aggiungere, con le cautele dell'asepsi, il contenuto di un flacone di RPF Supplement II (REF 423102) ricostituito secondo le istruzioni con 10 mL di acqua purificata sterile e pre-riscaldato a 48 °C ± 1 °C. Mescolare accuratamente e versare in piastre sterili in modo tale da ottenere uno strato di circa 4 mm.

CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in polvere: fine granulometria omogenea di colore paglierino

Aspetto del terreno in piastra (Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar): giallo, uniformemente opaco.

Aspetto del terreno in piastra (Baird Parker RPF Agar): beige, lievemente opalescente.

pH finale del terreno : $7,2 \pm 0,2$

CAMPIONI

Alimenti, mangimi, campioni della filiera alimentare, acque, cosmetici.

PROCEDURA DELL'ANALISI

ISO 6888-1 raccomanda la procedura qui di seguito riassunta con il terreno Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar.

Preparare la sospensione madre del campione le diluizioni successive con Maximum Recovery Diluent (REF 401691).

Con una pipetta sterile, trasferire 0,1 mL dell'aliquota di prova, se il campione è liquido, oppure 0.1 mL della sospensione madre in caso di altri prodotti, sulla superficie del terreno Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar in piastra. Ripetere le operazioni con le diluizioni successive, se necessario. I limiti della conta possono essere innalzati di un fattore 10, seminando 1 mL del campione di prova o della diluizione madre su una piastra da 140 mm oppure suddividendo l'aliquota su 3 piastre da 90 mm.

Distribuire l'inoculo su tutta la superficie del terreno e lasciar asciugare le piastre a temperatura ambiente per 15 minuti.

Incubare a 37°C ed eseguire una prima lettura dopo 24 ore. Segnare sul fondo delle piastre le colonie tipiche presenti.

Eseguire una seconda lettura dopo ulteriori 24 ore di incubazione, segnare le ulteriori colonie tipiche comparse ed eseguire il conteggio complessivo. Marcare anche tutte le colonie atipiche presenti.

ISO 6888-2 raccomanda la procedura qui di seguito riassunta con il terreno Baird Parker RPF Agar :

Munirsi di due piastre di Petri sterili. Nel caso il prodotto da esaminare fosse liquido, per mezzo di una pipetta sterile trasferire nelle piastre, in duplicato, 1 mL di campione. Per gli altri prodotti trasferire in piastra 1 mL della sospensione madre. Trasferire in altre 2 piastre 1 mL della prima diluizione decimale. Ripetere le operazioni con le diluizioni successive, impiegando una nuova pipetta sterile per ogni nuova diluizione.

Introdurre in ciascuna piastra di Petri, un volume di terreno di coltura mantenuto a 47°C- 50°C in modo tale da ottenere uno strato di circa 4 mm. Mescolare con cura l'inoculo con il terreno di coltura e lasciare solidificare posizionando le piastre su una superficie orizzontale fredda.

Dopo completa solidificazione, introdurre le piastre capovolte in termostato ed incubare per 18-24 ore a 37 °C. Se necessario re-incubare per ulteriori 18 - 24 ore.

ISO 6888-3 prevede il test "presenza/assenza" o la conta degli stafilococchi coagulasi positivi con metodo MPN con una semina della sospensione madre del campione e/o delle sue diluizioni decimali (in funzione della prova prescelta) in Giolitti e Cantoni Broth, un'incubazione delle provette per 24 h ± 2 h e per 48h a 37°C ed un trapianto delle brodo-colture su piastre di Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar o di Baird Parker RPF Agar. Per i dettagli operativi fare riferimento alla norma citata.

Il Rapporto Istan 07/5 riporta il metodo qui di seguito riassunto per la ricerca degli stafilococchi patogeni nelle acque destinate al consumo umano. Filtrare almeno 250 mL di campione attraverso una membrana sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con pori da 0,45 µm, seguendo scrupolosamente le norme di asepsi. Trasferire la membrana sul terreno Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar. Incubare a 36 ± 1 °C per 24 + 24 ore. Eseguire le prove di conferma della catalasi e della coagulasi

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar

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



Considerare preferenzialmente, per la conta, le piastre a due diluizioni successive che contengano al massimo 150 colonie tipiche e/o atipiche. Le colonie tipiche di *S.aureus* sono nere o grigio-nere, lucenti, convesse, di diametro 1-1,5 mm dopo 24 ore e di 1,5-2,5 mm dopo 48 ore, circondate da un alone di chiarificazione dell'uovo che può però apparire parzialmente opaco. Dopo 48 ore le colonie di *S.aureus* presentano sempre un doppio alone, uno interno opaco, dovuto ad una attività lipasica ed uno esterno trasparente. Occorre tuttavia considerare che *S.aureus* può coltivare con colonie atipiche, simili alle precedenti, ma senza alone. Tali colonie devono essere considerate sospette e contate a parte. Le colonie sospette atipiche si formano frequentemente da ceppi di *S.aureus* presenti in prodotti lattiero caseari, gamberi e frattaglie, sono rare invece per altri campioni alimentari.

Selezionare almeno 5 colonie tipiche se vi sono solo colonie tipiche, oppure anche 5 colonie atipiche, se presenti, e con esse preparare delle brodoculture di 24 ore in Brain Heart Infusion Broth. Con tali crescite eseguire il test della coagulasi come conferma o con plasma di coniglio (Coagulase Plasma EDTA REF 429937) o con piastre di Baird Parker RPF Agar.

Baird Parker RPF Agar

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

Gli stafilococchi coagulasi positivi formano colonie nere o grigie o perfino bianche circondate da un alone opaco, indice dell'attività coagulastica. Contare le colonie tipiche in ogni piastra.

Poiché il terreno di coltura contenente fibrinogeno e plasma di coniglio mette in evidenza la reazione della coagulasi, non è necessario procedere a test di conferma.

CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto dei prodotti qui descritti è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' comunque responsabilità 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 impiegando il terreno Baird Parker Egg Yolk Tellurite Agar.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE: T°/t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	37°C / 24-48 h / A	CRESCITA , COLONIE GRIGIO-NERE CON ALONE DI CHIARIFICAZIONE;
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	37°C / 24-48 h / A	CRESCITA , COLONIE GRIGIO-NERE CON ALONE DI CHIARIFICAZIONE;
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C / 48 h / A	INIBITO
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	37°C / 24-48 h / A	COLONIE GRIGIO NERE SENZA ALONE DI CHIARIFICAZIONE

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

LIMITI DEL METODO

- I metodi qui descritti si intendono applicabili alla conta degli stafilococchi coagulasi-positivi tra i quali si trovano ceppi in grado di generare enterotossine. Essi riguardano principalmente lo *Staphylococcus aureus*, ma anche lo *Staphylococcus intermedius* ed alcuni ceppi di *Staphylococcus hyicus*.
- La conferma degli stafilococchi coagulasi positivi si basa sulla positività alla reazione della coagulasi, tuttavia è noto che alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* sono caratterizzati da una modesta positività a tale reazione. Questi ceppi possono essere confusi con altri batteri, dai quali possono essere comunque distinti mediante l'uso di prove aggiuntive quali la sensibilità alla lisostafina, la produzione di emolisina, di termonucleasi e di acido a partire dal mannitolo.
- È preferibile utilizzare il terreno Baird Parker RPF Agar per quei prodotti alimentari (quali i formaggi prodotti a partire da latte crudo e certi prodotti derivati dalla lavorazione delle carni) che più facilmente possono essere contaminati da stafilococchi che formano colonie atipiche sul terreno con emulsione d'uovo o flora batterica concomitante, in grado di mascherare le colonie di cui si ricerca la presenza.
- Su Baird Parker RPF Agar le colonie di *Proteus* possono mostrare, all'inizio dell'incubazione, un aspetto simile a quello delle colonie di stafilococchi coagulasi-positivi. Comunque, trascorso un periodo di incubazione compreso tra 24 h e 48 h, esse acquistano l'aspetto di una coltura diffusa, di colore più o meno tendente al marrone, che ne consente la differenziazione dagli stafilococchi.
- Sul terreno possono coltivare anche alcuni ceppi di streptococchi, micrococchi, corinebatteri ed enterobatteri ma non sviluppano reazione tipiche; coltivano anche alcuni lieviti, funghi e bacilli facilmente distinguibili per la morfologia e il colore delle colonie.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Prima dell'uso consultare le Schede di Sicurezza dei prodotti qui descritti. I terreni in polvere devono essere manipolati con una adeguata protezione delle vie respiratorie.
- I terreni di coltura qui descritti contengono materie prime di origine animale. I controlli ante e post mortem degli animali e quelli durante il processo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolarli con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare). Scaricare da sito web www.biolifeitaliana.it il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alla TSE.
- I terreni di coltura qui descritti sono destinati ai controlli microbiologici dei campioni, sono per uso professionale e devono essere usati in Laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- La singola piastra dei prodotti qui descritti è monouso.



- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite.
- Smaltire il terreno in polvere, in flacone ed in piastra non impiegato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come materiali o componenti di fabbricazione.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza dei prodotti sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.

CONSERVAZIONE

Terreno in polvere: conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dall'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 agglomerati).

Terreni pronti all'uso in piastra: conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare le piastre con l'imballaggio deteriorato. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, colore alterato).

BIBLIOGRAFIA

- Baird-Parker, A.C. (1962) - An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl. Bact., 25, 12-19. • FDA (1995) Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. Revision A, 1998. Published by AOAC International.
- ISO 6888-1:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) -- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium
- ISO 6888-1:1999/Amd 2:2018 Inclusion of an alternative confirmation test using RPFa stab method.
- ISO 6888-2:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) -- Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium
- ISO 6888-3:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) -- Part 3: Detection and MPN technique for low numbers
- ISO 22718:2015 Cosmetics — Microbiology -Detection of Staphylococcus aureus
- Rapporti ISTISAN. 07/5: 2007. Istituto Superiore di Sanità. Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 - A cura di Lucia Bonadonna e Massimo Ottaviani.
- Smith, B.A. & Baird Parker, A.C. (1964) - The use of sulphamezathine for inhibiting Proteus spp. on Baird-Parker's isolation medium for Staphylococcus aureus. J. Appl. Bact., 27, 78-82.
- UNI EN ISO 6888-1:2004 Metodo orizzontale per la conta di stafilococchi coagulasi-positivi (Staphylococcus aureus e altre specie)- Tecnica che utilizza il terreno agar Baird-Parker
- UNI EN ISO 6888-2:2004 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la conta di stafilococchi coagulasi-positivi (Staphylococcus aureus e altre specie) - Tecnica che utilizza il terreno agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno
- UNI 10678:1998 Acque destinate al consumo umano-Ricerca e determinazione degli stafilococchi patogeni

CONFEZIONI

Descrizione	Tipo	Cat. N°	Confezione
Baird Parker Agar Base	Terreno in polvere	4011162 4011164	500 g (8,6 L) 5 Kg (86 L)
Baird Parker Agar (Egg Yolk Tellurite)	Piastre pronte all'uso Ø 90 mm	541116	20 piastre
Baird Parker Agar (Egg Yolk Tellurite)	Piastre pronte all'uso Ø 55 mm	491116	30 piastre
Baird Parker RPF Agar	Piastre pronte all'uso Ø 90 mm	543101	20 piastre

Sono disponibili per la ricerca degli stafilococchi coagulasi positivi i seguenti prodotti, per i quali si rimanda alla Scheda Tecnica specifica

Egg Yolk Tellurite Emulsion 20%	Arricchimento	423700 423701 423702	50 mL 100 mL 200 mL
RPF Supplement II	Arricchimento	423102 423102D	4 fiale da 10 mL (ciascuna per 100 mL di terreno) 4 fiale da 20 mL (ciascuna per 200 mL di terreno)

