REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

AGENTZIA REGIONALE PRO S'AMPARU DE S'AMBIENTE DE SARDIGNA
AGENZIA REGIONALE PER LA PROTEZIONE DELL'AMBIENTE DELLA SARDEGNA

ARPAS

Direzione Tecnico Scientifica

Servizio Rete Laboratori e misure in campo

Accordo quadro per la fornitura di terreni colturali per microbiologia disidratati e pronti da destinare ai Laboratori ARPAS, distinta in due lotti

Allegato 2

Schede tecniche composizione terreni colturali

Giugno 2018

Scheda 3: Acqua peptonata tamponata

ISO 19250: 2013

B.1 Buffered peptone water (BPW)

Enzymatic digest of casein	10,0 g
Sodium chloride (NaCl)	5,0 g
Disodium hydrogenphosphate dodecahydrate (Na2HPO4.12H20)*	9.0 g
Potassium dihydrogenphosphate (KH2PO4)	1,5 g
Water (7.2)	1000 ml

* If anhydrous disodium hydrogenphosphate (Na2HPO4) is used 3,5 g

Dissolve the components in the water, if necessary, by heating (without boiling).
Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is 7,0 ± 0,2 at 25 °C.
Dispense the medium into flasks of suitable capacity to obtain the portions necessary for the test.
Sterilize in the autoclave (5.2) set at (121 ± 3) °C for 15 min.
Store at (5 ± 3) °C for up to 3 months.

Scheda 6 : Baird Parker agar

***Rapporti ISTISAN* 07/05 - ISS A 018A rev. 00**

2.1.4.1. Terreno di base Agar Baird Parker

Composizione

Triptone	10 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	1 g
Glicina	12 g
Piruvato di sodio	10 g
Cloruro di litio	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 ml

pH 6,8±0,2

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Lasciare raffreddare fino alla temperatura di (50 ± 5) °C prima di aggiungere il supplemento.

2.1.4.2. Emulsione di tuorlo d'uovo e tellurito di potassio al 3,5%

L'emulsione, già pronta, è disponibile in commercio. Il tellurito di potassio è classificato come **Xi** - Irritante. Nella manipolazione seguire le istruzioni della ditta produttrice e adottare precauzioni per la protezione respiratoria, delle mani e della pelle.

2.1.4.3. Terreno completo Agar Baird Parker

Composizione

Terreno di base (2.1.4.1.) 1000 mL
Emulsione di tuorlo d'uovo (2.1.4.2.) 50 mL

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (2.1.4.1.) 50 ml di emulsione di tuorlo d'uovo al tellurito di potassio (2.1.4.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e distribuire, rispettando le comuni regole di asepsi, in capsule di Petri.
Il terreno, pronto per l'uso, può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di 7 giorni in condizioni ottimali.

Scheda 7 : Agar bile esculina azide

APAT IRSA CNR 7040 Metodi rapidi A e ISO 7899-2:2003

3.2.1.1 Terreno Bile Esculina Azide

Composizione:

Triptone	17,0 g
Peptone	3,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Bile	10,0 g
Esculina	1,0 g
Ferro (III) ammonio citrato	0,5 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio azide	0,15 g
Agar	8,0 - 18,0 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,1± 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L). Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione.
Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121± 3°C per 15 ±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

UNI EN ISO 7899-: 2003

Agar contenente bile, esculina ed azide
Composizione

Triptone 17,0 g
Peptone 3,0 g
Estratto di lievito 5,0 g
Bile bovina, disidratata 10,0 g
Cloruro di sodio (NaCl) 5,0 g
Esculina 1,0 g
Citrato di ferro (III) e di ammonio 0,5 g
Azide sodica (NaN3) 0,15 g
Agar da 8 g a 18 gl)
Acqua 1 000 ml

Sciogliere gli ingredienti in acqua portata all'ebollizione. Regolare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione il suo valore sia 7,1 ±0,1 a 25 °C.
Sterilizzare per 15 min a 121 °C ± 3 °C. Raffreddare a temperatura compresa tra 50 °C e 60 °C e versare in capsule di Petri uno strato tra 3 mm e 5 mm e lasciar solidificare su una superficie fredda orizzontale.
Le piastre così predisposte possono essere conservate a 5 °C ± 3 °C fino a 2 settimane.

Scheda 8 : Brain Hearth Infusion

***Rapporti ISTISAN* 07/05 - ISS A 018A rev. 00**

2.1.4.5. Infuso Cuore Cervello

Composizione:

Infuso di cervello di vitello	200,0 g
Infuso di cuore di bue	250,0 g
Peptocomplex	10,0 g
Glucosio	2,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio fosfato bibasico	2,5 g
Acqua distillata	1000 mL

pH 7,4±0,2

Scheda 14 : Nutriente agar

UNI EN ISO 19250:2010

4.2.7. Agar Nutritivo

Composizione:

Meat extract	3,0 g
Enzimatic digest of peptone	5,0 g
Water	1000 mL
Agar	9,0 - 18,0 g
pH 7,4±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente.
Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min.
Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3) °C per non più di 2 mesi in condizioni ottimali.

ISO 16266:2008

5.2.3 Nutrient agar

Composizione

Peptone	5,0 g
Meat extract	1,0 g
Yeast extract	2,0 g
Sodium chloride (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Water	1000 ml

Scheda 15 : Tryptone Bile X-Glucuronide Agar (TBX)

APAT IRSA CNR - 7030 F

7.4.1 Tryptone Bile X-Glucuronide Agar

Composizione:

Triptone	20,0 g	
Sali di bile n. 3	1,5 g	
X-Gluc	0,075 g	(5-Br-4-Cl-3-indolil β-D-glucuronide)
Agar	15,0 g	
Acqua distillata	1000 mL	
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Scheda 16 : Tryptone soy agar

UNI EN ISO 9308-1:2014

71 Agar Triptone- Caseina - Soia

Composizione:

triptone	15,0 g
peptone di soia	5,0 g
cloruro di sodio	5,0 g
agar	15,0 – 25,0 g
acqua distillata	1000 ml
pH 7,2 ± 0,1	

Scheda 17 : TSC agar con cicloserina (Triptosio solfito cicloserina agar)

Rapporti ISTISAN 07/05 - ISS A 005B rev. 00

2.2.4.1 Terreno di base: Triptosio Solfito Cicloserina Agar

Composizione:

Triptosio	15,0 g
Soia peptone	5,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Sodio metabisolfito	1,0 g
Ferro ammonio citrato	1,0 g
Agar	12,0 g
Acqua distillata	1000 mL

2.2.4.2. Soluzione di D-cicloserina

Composizione

D-cicloserina	4,0 g
Acqua distillata	100 mL

2.2.4.3. Terreno completo al Triptosio Solfito Cicloserina Agar

Composizione

Terreno di base (2.2.4.1.)	1000 mL
Soluzione di cicloserina (2.2.4.2.)	10 mL

pH 7,6±0,2

Scheda 26 : TSC agar con cicloserina (Sulfite cicloserina agar)

Rapporti ISTISAN 07/05 ISS A 005B rev.00

2.2.4.1 Terreno di base: Triptosio Solfito Cicloserina Agar

Composizione

Triptosio	15,0 g
Soia peptone	5,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Sodio metabisolfito	1,0 g
Ferro ammonio citrato	1,0 g
Agar	12,0 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Preparare il terreno preferibilmente al momento dell'uso. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata, sterilizzare a (121 } 3) °C per 15 minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere una soluzione di D-cicloserina.

2.2.4.2. Soluzione di D-cicloserina

Composizione

D-cicloserina	4,0 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere la D-cicloserina in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione su una membrana con pori di porosità nominale di 0,2 µm. Conservare la soluzione a (-20 } 5) °C per non più di un mese in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

Scheda 33: Agar verde brillante modificato

Brilliant Green Agar (BGA)

Composizione

Estratto di lievito	g 3,0
Peptone proteosico Bacto	g 10,0
Lattosio	g 10,0
Saccarosio	g 10,0
Cloruro di sodio	g 5,0
Rosso fenolo	g 0,08
Agar	g 20,0
Verde brillante	mg12,5

pH 6,9 +/- 0,2

OPPURE

Brilliant Green Agar (modified)

Lab-Lemco (estratto di carne)	g/l	5,0
Peptone batteriologico	g/l	10,0
estratto di lievito	g/l	3,0
Sodio fosfato monoacido	g/l	1,0
Sodio fosfato biacido	g/l	0,6
Lattosio	g/l	10,0
Saccarosio	g/l	10,0
Rosso fenolo	g/l	0,09
Verde brillante	g/l	0,0047
Lemco ammonio citrato	g/l	0,02
Agar n.1	g	12,0

pH finale 6,9 ± 0,2

Scheda 39 : Lactose broth

APAT IRSA CNR 7010 A

5.1 – Brodo lattosato (Lactose broth)

Composizione

Estratto di carne	g	3,0
Peptone	g	5,0
Lattosio	g	5,0
acqua distillata	ml	1000

pH 6,9 ± 0,2

Il terreno si conserva a temperatura ambiente (evitare l'uso del frigorifero) per circa 1 settimana.

Scheda 40 : Brodo bile verde brillante 2%

APAT IRSA CNR 7010 A

5.2 – Brodo lattosio bile verde brillante (Brillant green lactose bile broth)

Composizione

Peptone	10,0 g
Lattosio	10,0 g
Bile disidratata in polvere	20,0 g
Verde Brillante	13,3 mg
acqua distillata	ml 1000

pH 7,2 ± 0,2

Seguire le istruzioni di preparazione, sterilizzazione e conservazione indicate nel metodo di riferimento.

Scheda 41 : Ethil violet azide broth

APAT IRSA CNR 7040 A

5.7 – Brodo azide etil violetto (Ethil violet azide broth)

Composizione

Peptone	20,0 g
Destrosio	5,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,7 g
Potassio diidrogeno fosfato	2,7 g
Sodio azide	0,4 g
Violetto di etile	0,83 mg
Acqua distillata	ml 1000

pH 7,0 ± 0,2.

Seguire le istruzioni di preparazione, sterilizzazione e conservazione indicate nel metodo di riferimento.

Scheda 43 : Azide destrose broth

APAT IRSA CNR 7040 A

5.6 – Brodo azide destrosio (Azide destrose broth)

Composizione

Estratto di carne	g	4,5
Peptone	g	15,0
Glucosio	g	7,5
Sodio cloruro	g	7,5
Sodio azide (azoturo di sodio)	g	0,2
Acqua distillata	ml	1000
pH (dopo sterilizzazione)		7,2 + 0,2

Seguire le istruzioni di preparazione, sterilizzazione e conservazione indicate nel metodo di riferimento.

Scheda 44 : Hektoen enteric agar

APAT IRSA CNR 7080

5.5 – Hektoen enteric agar

Composizione

Peptone	g	12,0
Estratto di lievito	g	3,0
Lattosio	g	12,0
Saccarosio	g	12,0
Salicina	g	2,0
Sali biliari n. 3	g	9,0
Sodio cloruro	g	5,0
Sodio iposolfito	g	5,0
Citrato ferrico ammoniacale	g	1,5
Fucsina acida	mg	40,0
Blu di Bromotimolo	mg	64,0
Agar	g	13,5
Acqua distillata	ml	1000

pH 7,6 ± 0,2

Seguire le istruzioni di preparazione, sterilizzazione e conservazione indicate nel metodo di riferimento.

Scheda 45 : Selenite cistine broth

UNI EN ISO 19250:2013

5.2 – Brodo Selenite cistina (Selenite cystine broth)

Composizione

Tryptone	g	5,0
Lactose	g	4,0
Disodium Hydrogenphosphate (Na_2 HPO_4)	g	10,0
Sodium biselenite (Na $HSeO_3$)	g	4,0
L-Cystine	g	0,01
Water	ml	1000

Seguire le istruzioni di preparazione, sterilizzazione e conservazione indicate nel metodo di riferimento.

Scheda 54 : Agar yeast extract

ISO 6222: 2001

Yeast extract agar

Composizione

Ttyptone (Peptone from Casein, pancr.)	6,0 g
Dehydrated yeast extract	3,0 g
Agar powdered or in pellets	10 g to 20 g (according to gel strength)
Water	1000 ml

Add the ingredients or the complete dehydrated medium to the water and dissolve by heating. Adjust the pH if necessary so that after sterilization it will be 7,2 ± 0.2 at 25 °C.
Distribute volumes o1 15 ml to 20 ml in tubes, bottles or other containers. For storage in larger volumes, use containers up to 500 ml capacity. Sterilise in the autoclave (5.1) at (121± 3)°C for (15 ± 1) minutes.
For use, melt the medium, allow to cool and maintain it at (45 ±1) °C using the water bath (5.5). It is recommended to store the medium no1 longer than 4 h at 45 °C, after which time the medium shall be discarded.

Scheda 55 : Slanetz Bartley agar

ISO 7899:2003

Slanetz and Bartley medium

Basal medium

Tryptose	20,0 g
Yeast extract	5,0 g
Glucose	2,0 g
Dipotassium hydrogenphosphate (K_2HP0_4)	4,0 g
Sodium azide (NaN_3)	0,4 g
Agar	8 g to18 g
Water	1000 ml

Dissolve the ingredients in boiling water.
Once dissolution is complete, heat for an additional 5 min.
Cool to 50 "C to 60 "C.

TTC solution

2,3,5-triphenyitetrazolium chloride	1,0 g
Water	100 ml

Dissolve the indicator in the water by stirring.
Sterilize by filtration (0,2 mm).
Protect the solution against the action o1 light, and discard it if a pink tinge develops.

Complete medium

Basal medium (6.3.1.1) 1 000 ml
TTC solution (6.3.1.2) 10 ml

Add the TTC solution to the basal medium cooled to 50 °C to 60 °C.
Adjust the pH if necessary so that after sterilization it is 7,2 ± 0,1 at 25 °C, with a solution of sodium carbonate (100 g/l) or of sodium hydroxide (40 g/l) or of hydrochloric acid (36,5 g/l).
Pour 20 ml of medium into Petri dishes of 9 cm diameter (or an equivalent amount in a dish of another size) and allow lo set on a cool. horizontal surface.
Poured plates can be stored in the dark for up to 2 weeks at 5 °C ± 3 °C.

Scheda 64 : Pseudomonas CN Agar base con supplemento

ISO 16266:2008

Pseudomonas Agar base/CN-agar

Gelatin peptone	16,0 g
Casein hydrolysate	10,0 g
Potassium sulfate (anhydrous) (K_2SO_4)	10,0 g
Magnesium chloride (anhydrous) ($MgCl_2$)	1,4 g
Glycerol	10,0 g
Agar	11 g to 18 g
Water (distilled or equivalent)	1000 ml

The amount of agar required is dependent on the gel strength. Follow the manufacture's instructions for the agar used.

CN Supplement

Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetrimide)	0,2 g
Nalidixic Acid	0,015 g

The final pH of the solidified medium should correspond to 7,1 ± 0,2 at 25°C.
Store prepared plates in the dark protected from dessication at 5 ± 3 °C and use within 1 months. Do not keep the agar molten for more than 4 h. Do not remelt the medium.

Scheda 65 : King's B Medium

ISO 16266:2008

King's B Medium

Peptone	20,0 g
Glycerol	10,0 ml
Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	1,5 g
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,5 g
Agar	15,0 g
Water(distilled or equivalent)	1000 ml

Preparation

Dissolve the ingredient in the water by heating. Cool down to (45 to 50) °C and adjust the pH corresponding to 7,2 ± 0,2 at °25C, using either hydrochloric acid or sodium hydroxide. Dispense the medium in 5 ml aliquots into culture tubes which are capped and autoclaved at 121 ± 3 °C for 15 min. Allow the tubes to cool and solidify in slants.

Store in the dark at 5 ± 3 °C and use within 3 months.

Scheda 66 : Acetamide Broth

ISO 16266:2008

Acetamide Broth

Solution A

Potassiurn di-hydragenphosphat'e (KH_2PO_4)	1,0 g
Magnesium sulfate arihydrous ($MgSO_4$)	0,2 g
Acetamide	2,0 g
Sodium Chloride (NaCl)	0,2 g
Water (distilled or equivalent, ammonia free)	900 ml

Dissolve the ingredients in water and then adjust the pH to correspond to 7,0 ± 0,5 at 25 "C with either hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Solution B

Sodium molybdate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,5 g
Iron sulfate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,05 g
Water	100 ml

Preparation

To prepare the acetamide broth, add 1 ml of solution 6 to 900 ml of a freshly prepared solution A (5.3.2.1). Add water with constant stirring to a total volume of 1 I. Dispense this mixture in 5 ml aliquots to culture tubes which are then capped and sterilised in an autoclave at (121 ± 3) °C for 15 min. Store in the dark at (5 ± 3) °C and use within 3 months.

Scheda 70: Triple sugar/iron agar (TSI agar)

ISO 19250:2013

Triple sugar/iron agar (TSI agar)

Meat extract	3,0 g	
Yeast extract	3,0 g	
Enzymatic digest of peptone	20,0 g	
Sodium chloride (NaCl)	5,0 g	
Lactose	10,0 g	
Sucrose	10,0 g	
Glucose	1,0 g	
Iron(III) citrate	0,3 g	
Sodium thiosulfate(Na2S2O3)	0,3 g	
Phenol red	0,024 g	
Agar	9 g to 18 g	
Water (7.2)	1000 ml	Dependent on the gel strength of the agar.

Dissolve the components in the water, if necessary by heating.
Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is 7,4 ± 0,2 at 25 °C. Dispense the medium in quantities of 10 ml into tubes, preferably with screw caps.
Sterilize in the autoclave (5.2) at (121 ± 3) °C for 15 min. Allow to set in a sloping position to give a butt of depth 25 mm to 50 mm.
Store the tubes for up to 1 month at (5 ± 3) °C.

Scheda 73 : Triptofano brodo

QUADERNI 64/ISSN 0390-6329:1983 VOL.1°

Triptofano brodo

Composizione

triptone	g 10,0
L-triptofano	g 1,0
sodio cloruro	g 5,0
acqua distillata	ml 1000

pH 7,5 ± 0,1

Scheda 80: Blood agar con 5% sangue di montone

E' possibile utilizzare Columbia agar o qualsiasi altro analogo idoneo terreno.

Columbia Agar with 5% Sheep Blood

Composizione:

Digerito pancreatico di caseina	12,0 g
Digerito peptico di tessuto animale	5,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne bovina	3,0 g
Amido di granturco	1,0 g
Cloruro di sodio	5,0 g
Agar	13,5 g
Sangue di montone defibrinato	5 %

pH 7,3 ± 0,2

Scheda 81: Lactose gelatina medium

Rapporti ISTISAN 07/5 – Metodo ISS A 005B rev.00

2.2.4.7. Terreno di base al lattosio-gelatina

Composizione:

Digerito enzimatico di caseina	15,0 g
Estratto di lievito	10,0 g
Gelatina	120,0 g
Acqua distillata	1000 mL

Dissolvere gli ingredienti in 1 L di acqua distillata e aggiungere lattosio (2.2.4.8.) e la soluzione di rosso fenolo (2.2.4.9.) secondo le indicazioni.

2.2.4.8. Lattosio

Aggiungere 10 g di lattosio al terreno di base (2.2.4.7.) e miscelare con cura.

2.2.4.9. Soluzione di rosso fenolo

Composizione Rosso fenolo	4,0 g
Acqua distillata	100 mL

Dissolvere il rosso fenolo in acqua distillata e aggiungere 12,5 mL della soluzione al terreno di base (2.2.4.7)

Scheda 82: Mannitol Salt agar

Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 018B rev.00

2.2.4.1. Substrato d'isolamento Agar Sale Mannite

Composizione

Estratto di carne	1,0 g
Peptocomplex	10,0 g
Mannitolo	10,0 g
Sodio cloruro	75,0 g
Rosso fenolo	0,025 g
Agar	15,0 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,4±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Raffreddare fino alla temperatura di (50 ± 5) °C e distribuire in capsule di Petri. Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di 7 giorni in condizioni ottimali.

Scheda 83: Nitrate motility medium + reattivi al nitrato

Rapporti ISTISAN 07/5 – Metodo ISS A 005B rev.00

2.2.4.4. Terreno al nitrato e per la motilità

Composizione:

Estratto di carne	3,0 g
Peptone	5,0 g
Nitrato di potassio	1,0 g
D-galattosio	5,0 g
Glicerolo	5,0 g
Disodio idrogeno fosfato	2,5 g
Agar	5,0 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3±0,1	

Dissolvere tutti gli ingredienti, tranne il glicerolo, in 950 mL di acqua distillata portando a ebollizione. Sciogliere, separatamente, in una beuta il glicerolo in 50 mL di acqua distillata e aggiungere la soluzione al terreno 2.2.4.4. mescolando accuratamente. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.2.4.5. Reagente A al nitrato

Composizione:

Acido sulfanilico	0,8 g
Acido acetico (15% in volume)	100 mL

Dissolvere l'acido sulfanilico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione. Conservare, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a (5 ± 3) °C.

2.2.4.6. Reagente B al nitrato

Composizione:

5-amino-2-naftelene-acido sulfonico	0,6 g
Acido acetico (15% in volume)	100 mL

Dissolvere il 5-amino-2-naftelene-acido sulfonico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione. Conservare, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a (5 ± 3) °C.

Scheda 84: Nutrient broth

Rapporti ISTISAN 07/5 ISS A 018B rev. 00

Composizione:

Estratto di carne	g 3,0
Peptone	g 5,0
Acqua distillata	ml 1000
pH 7,2	

Scheda 85: Rappaport Vassiliadis con soia (RVS broth)

UNI EN ISO 19250: 2013

B.2 Rappaport-Vassiliadis broth with soya (RVS)

B.2.1 Basic medium, Solution A

Enzymatic digest of soya	5,0 g
Sodium chloride (NaCl)	8,0 g
Potassium dihydrogenphosphate (KH2PO4)	1,4 g
Dipotassium hydrogenphosphate (K2HPO4)	0,2 g
Water (7.2)	1000 ml

Dissolve the components in the water, if necessary, by heating to about 70 °C. Prepare the solution on the day of preparation of the RVS medium.

B.2.2 Solution B

Magnesium chloride hexahydrate (MgC12.6H20)	400 g
Water (7.2)	1000 ml

Dissolve the magnesium chloride in the water.
In contrast to the usual preparation of reagent solutions, but in accordance with the originai formula of References [5][6], add the substance to the volume of water indicated to a total volume of 1,26 l.
As this salt is very hygroscopic, it is advisable to dissolve the entire contents of MgC12-6H20 from a newly opened container. For instance, add 250 g of MgC12.6H20 to 625 ml of water, to a total volume of 788 ml and a mass concentration of about 31,7 g of MgC12.6H20 per 100 ml.
The solution is stable for at least 2 years, if stored in a tightly stoppered brown glass bottle at room temperature.

Scheda 86: Sabouraud Dextrose Agar con cloramfenicolo

Rapporti ISTISAN 07/5 Metodo - ISS A 016B rev. 00

2.2.4.1. Sabouraud Dextrose Agar da addizionare con cloramfenicolo

Composizione:

Peptone micologico	10,0 g
Destrosio	40,0 g
Agar	15,0 g
Cloramfenicolo	0,05 g
Acqua distillata	1000 ml
pH 5,6±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per la completa soluzione degli ingredienti. Dopo aver sciolto la polvere, sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Dopo la sterilizzazione, si consiglia di modificare il pH del terreno ancora in fase liquida con una soluzione di acido lattico sterile al 10% (2.2.4.2.), in modo da ottenere un valore di pH 4,5±0,2. L'abbassamento del pH favorisce la riduzione della crescita batterica, la cui preponderanza potrebbe disturbare la crescita fungina. Distribuire in capsule di Petri, lasciare solidificare. Tutte le operazioni devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a (5 ± 3) °C per non più di due settimane in condizioni ottimali. °C per non più di due settimane in condizioni ottimali. Per garantire una maggiore selettività del metodo, è possibile aggiungere al terreno l'antibiotico *cloramfenicolo*, secondo le specifiche operative.(Cloramfenicolo 0,05 g).

Scheda 87: Agar Xilosio Lisina Desossicolato (XLD)

UNI EN ISO 19250:2013

B.3 Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar)

D(+)-Xylose	3,75 g
L(+)-Lysine hydrochloride	5,0 g
Sodium deoxycholate	1,0 g
Yeast extract	3,0 g
Sucrose	7,5 g
Lactose	7,5 g
Sodium chloride (NaCl)	5,0 g
Sodium thiosulfate (Na2S2O3)	6,8 g
Iron(III) ammonium citrate	0,8 g
Phenol red	0,08 g
Agar	9 g to 18 g
Water (7.2)	1 000 ml

Dissolve the components in the water and heat with frequent agitation. Do not overheat or boil.
Cool immediately in a water bath to 45 °C to 50 °C. Excessive heating or prolonged cooling may cause precipitation.
Adjust the pH, if necessary, so that it is 7,4 ± 0,2 at 25 °C.
Pour into Petri dishes and store the cooled medium in sealed plastic bags for up to 2 weeks at (5 ± 3) °C. If necessary, dry the plates before use.

Scheda 88 :
Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn)

UNI EN ISO 19250: 2013

Enzymatic digest of meat extract	4,3 g
Enzymatic digest of casein	8,6 g
Sodium chloride (NaCl)	2,6 g
Calcium carbonate (CaCO3)	38,7 g
Sodium thiosulfate pentahydrate (Na2S203.5H20)	47,8 g
Ox bile for bacteriological use	4,78 g
Brilliant green	9,6 mg
Water (7.2)	1000 ml

Dissolve the dehydrated basic components or the dehydrated complete medium in the water by boiling for 5 min. Adjust the pH, if necessary, so that it is 8,2 ± 0,2 at 25 °C.
Thoroughly mix the medium and aseptically dispense into sterile tubes in 10 ml volumes. The base medium may be stored for up to 4 weeks at (5 ± 3) °C.

B.9.2 Iodine and iodide solution

Iodine (I_2)	20,0 g
Potassium iodide (KI)	25,0 g
Water (7.2)	100 ml

Completely dissolve the potassium iodide in 10 ml of water, then add the iodine and dilute to 100 ml with water. Do not heat.
Stare the prepared solution in the dark at ambient temperature in a tightly closed container.

B.9.3 Novobiocin solution

Novobiocin sodium salt	0,04 g
Water (7.2)	5 ml

Dissolve the novobiocin sodium salt in the water and sterilize by filtration. Store for up to 4 weeks at (3 ± 2) °C.

Scheda 89 : Urea agar (Christensen)

UNI EN ISO 19250: 2013

B.6.1

Enzymatic digest of peptone	1,0 g
Glucose	1,0 g
Sodium chloride (NaCl)	5,0 g
Potassium dihydrogenphosphate (KH2PO4)	2,0 g
Phenol red	0,012 g
Agar	9 g to 18 g
Water (7.2) 1 000 ml	

Dissolve the components or the dehydrated complete base in the water, if necessary, by heating. Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is 6,8 ± 0,2 at 25 °C.
Sterilize in the autoclave (5.2) at (121 ± 3) °C for 15 min. After autoclaving, cool it in a water bath to about 50 °C.
Store for up to 1 month at (5 ± 3) °C.

B.6.2 Urea solution

Urea	400 g
Water (7.2)	to a final volume of 1 000 ml

Dissolve the urea in the water and sterilize the solution by filtration. Store for up to 1 month at (5 ± 3) °C.

B.6.3. Complete medium

Base (B.6.1)	950 ml
Urea solution (B.6.2)	50 ml

Add, under aseptic conditions, the urea solution to the base, previously melted and then cooled to (45 ± 0,1) °C
Adjust the pH, if necessary, so that it is 6,8 ± 0,2 at 25 °C.
Dispense the complete medium into sterile tubes in quantities of 10 ml.
Allow to set in a sloping position.
Store the tubes for up to 7 d at (5 ± 3) °C.

Scheda 90 : L-Lysine decarboxylation medium

UNI EN ISO 19250: 2013

L-Lysine monohydrochloride	5,0 g
Yeast extract	3,0 g
Glucose	1,0 g
Bromocresol purple	0,015 g
Water (7.2)	1000 ml

Dissolve the components in the water, if necessary, by heating.
Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is 6,8 ± 0,2 at 25 °C.
Dispense the medium in quantities of 2 ml to 5 ml into sterile, narrow tubes, preferably with screw caps. Sterilize in the autoclave (5.2) at (121 ± 3) °C for 15 min. Store the tubes for up to 3 months at (5 ± 3) °C.