

## Bile Esculin Azide Agar (BEA)

| Catalog # | Description  |
|-----------|--|
| 3563994   | <b>Bile Esculin Azide Agar (BEA)</b> , ready-to-use, 90 mm x 20 dishes |
| 3564184   | <b>Bile Esculin Azide Agar (BEA)</b> , dehydrated, 500 g               |

For laboratory use only.

### Intended Use

Selective agar used for confirmation in the detection and enumeration of enterococci (Lancefield group D) in water (membrane filtration method). It is possible to use this medium for the detection and enumeration of *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* and *E. hirae* as well as other species of *Enterococcus* and certain species of the *Streptococcus* genus (particularly *S. bovis* and *S. equinus*).

### Principle

The medium relies on the ability of enterococci to hydrolyze esculin. The final product, dihydroxy-6,7-coumarin, combines with iron ions to produce a dark to black-colored compound that diffuses into the medium (black halo around the colonies). The presence of sodium azide and bovine bile renders inhibits the growth of other bacteria.

### Theoretical Composition

#### Base Medium

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| Tryptone                         | 17 g     |
| Peptone                          | 3 g      |
| Yeast extract                    | 5 g      |
| Dehydrated bovine bile           | 10 g     |
| Sodium chloride (NaCl)           | 5 g      |
| Esculin                          | 1 g      |
| Ferric ammonium citrate          | 500 mg   |
| Sodium azide (NaN <sub>3</sub> ) | 150 mg   |
| Agar                             | 15 g     |
| Distilled water                  | 1,000 ml |
| Final pH at 25°C = 7.1 ± 0.2     |          |

### Shelf Life and Storage

Store ready-to-use medium at 2–8°C protected from light. Store dehydrated medium at 15–25°C in carefully sealed bottles in a cool, dry place. Store media prepared from dehydrated base for 2 weeks at 2–8°C protected from light.

### Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

#### Equipment

- All usual laboratory equipment
- Incubators or incubation room
- Scales
- Stirrer/homogenizer
- Vortexer

### Supplies

- Pyrex bottles with autoclave proof stoppers (125ml/500ml)
- Sterile petri dishes ( $\varnothing = 55$  or 90 mm)
- Sterile pasteur pipettes or inoculating loops
- Slanetz & Bartley Agar (catalog #3563716, ready-to-use, 55 mm x 10 dishes; #3563981, ready-to-use, 55 mm x 100 dishes; #3564934, dehydrated, 500g)

### Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 8199). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria
- Media that have come in contact with water samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit [bio-rad.com](http://bio-rad.com)

### Quality Control

Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file.

### Protocol

#### Dehydrated Medium Preparation

- Shake before use
- Dissolve 56.7 g of powder in 1 L of sterile distilled water
- Wait 5 min, then mix until a homogenous suspension is obtained
- Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil until completely dissolved
- If necessary, adjust pH so that after autoclaving it is  $7.1 \pm 0.1$
- Dispense 100 ml or 250 ml per bottle. Sterilize in autoclave at  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  for 15 min
- Cool to  $47 \pm 2^\circ\text{C}$ . Pour into petri dishes (3-5 mm thickness), avoiding the creation of air bubbles and let dry

**Reconstitution Ratio:** 56.7 g/L (500 g of powder makes 8.8 L of medium)

#### Sample Preparation

- Prepare samples according to the standards for the product concerned

#### Detection of Suspect Intestinal Enterococci

- Prepare samples according to the standards for the product concerned

#### Inoculation and Incubation

- Use Slanetz and Bartley agar according to ISO 7899-2
- If typical colonies are present on Slanetz and Bartley agar, transfer membrane (without turning it over) to a petri dish of pre-warmed ( $44^\circ\text{C}$ ) BEA agar
- Incubate inverted at  $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for 2 hr

#### Reading and Interpretation

- After incubation, immediately examine the membranes for typical intestinal enterococci colonies (brown to black colonies in the surrounding medium)

**Note:** Reading may be rendered difficult by diffusion of color to adjacent colonies

## References

Colobert, L, and Morelis, P. (1958) New selective medium for the isolation of enterococci ; of practical use for their research and their enumeration in water. *Annals of the Institute Pasteur*, 94 (1): 120-122

Isemberg, HG, Goldbert D, and Sampson, J. (1970) Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium. *Applied Microbiology*, 20: 433-436

ISO 7899-2:2000. Water quality — Detection and enumeration of intestinal Enterococci — Part 2: Membrane filtration method

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

Rodier, J. (1984) Enumeration of presumptive fecal streptococcus. *Water Analysis*, 7: 827

## Revision History

| Release date | Document number | Change  |
|--------------|-----------------|---|
| July 2021    | 5073 Ver A      | <ul style="list-style-type: none"><li>- Major change</li><li>- New document design</li><li>- Document number change — previous version: V5_05-08_11</li></ul> |

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. All trademarks used herein are the property of their respective owner.

## Bile Esculin Azide Agar (BEA)

| Référence | Description   |
|-----------|---|
| 3563994   | <b>Bile Esculin Azide Agar (BEA)</b> , prêt à l'emploi, 90 mm x 20 boîtes |
| 3564184   | <b>Bile Esculin Azide Agar (BEA)</b> , base déshydratée, 500 g            |

Uniquement pour une utilisation en laboratoire.

### Usage prévu

Gélose sélective utilisée comme confirmation dans la recherche et le dénombrement des entérocoques (groupe D de Lancefield) dans les eaux (méthode de filtration sur membrane). Il est possible d'utiliser ce milieu pour la recherche et le dénombrement des *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* et *E. hirae* ainsi que d'autres espèces d'entérocoques et certaines espèces de streptocoques (en particulier *S. bovis* et *S. equinus*).

### Principe

Le milieu repose sur la capacité des entérocoques à hydrolyser l'esculine. Le produit qui en résulte, 6,7-dihydroxycoumarine, se combine à des ions ferriques pour former un composé noir ou de coloration noire qui se diffuse dans le milieu (halo noir autour des colonies). La présence d'azoture de sodium et de bile bovine inhibe le développement des autres bactéries.

### Formule théorique

#### Milieu de base

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| Tryptone                              | 17 g     |
| Peptone                               | 3 g      |
| Extrait de levure                     | 5 g      |
| Bile bovine déshydratée               | 10 g     |
| Chlorure de sodium (NaCl)             | 5 g      |
| Esculine                              | 1 g      |
| Citrate d'ammonium ferrique           | 500 mg   |
| Azoture de sodium (NaN <sub>3</sub> ) | 150 mg   |
| Agar                                  | 15 g     |
| Eau distillée                         | 1 000 ml |

pH final à 25 °C = 7,1 ± 0,2

### Durée de conservation et stockage

Milieu prêt à l'emploi : 2–8 °C à l'abri de la lumière. Milieu déshydraté : 15–25 °C en flacons soigneusement scellés, dans un endroit froid et sec. Milieu préparé à partir de la base déshydratée : pendant 2 semaines à 2–8 °C à l'abri de la lumière.

### Matériel requis non fourni

Liste non exhaustive.

#### Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Incubateurs ou salle d'incubation
- Balances
- Agitateur-homogénéisateur
- Agitateur-mélangeur vortex

## Produits

- Flacons en Pyrex avec bouchons autoclavables (125 ml/500 ml)
- Boîtes de Petri stériles ( $\varnothing = 55$  ou 90 mm)
- Pipettes Pasteur stériles ou anses d'inoculation
- Slanetz & Bartley Agar (n° de référence 3563716, prêt à l'emploi, 55 mm x 10 boîtes ; 3563981, prêt à l'emploi, 55 mm x 100 boîtes ; 3564934, base déshydratée, 500 g)

## Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 8199). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons d'eau doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales
- Pour obtenir les informations sur la sécurité du produit (fiche de données de sécurité, FDS) et le certificat d'analyse, visiter **bio-rad.com**

## Contrôle qualité

Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.

## Protocole

### Préparation du milieu déshydraté

- Agiter avant utilisation
- Dissoudre 56,7 g de poudre dans 1 L d'eau distillée stérile
- Attendre 5 minutes et mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène
- Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition jusqu'à dissolution complète
- Si nécessaire, ajuster le pH de façon à atteindre  $7,1 \pm 0,1$  après autoclavage
- Distribuer 100 ml ou 250 ml par flacon. Stériliser en autoclave à  $121 \pm 3$  °C pendant 15 min
- Laisser refroidir à  $47 \pm 2$  °C. Verser dans des boîtes de Petri (3–5 mm d'épaisseur) en évitant la formation de bulles d'air et laisser sécher

**Taux de reconstitution :** 56,7 g/L (500 g de poudre donnent 8,8 L de milieu)

### Préparation des échantillons

- Préparer les échantillons conformément aux normes applicables au produit concerné

### Recherche d'entérocoques intestinaux suspects

- Préparer les échantillons conformément aux normes applicables au produit concerné

### Inoculation et incubation

- Utiliser de la gélose de Slanetz et Bartley conformément à la norme ISO 7899-2
- En présence de colonies caractéristiques sur la gélose de Slanetz et Bartley, transférer la membrane (sans la retourner) dans une boîte de Petri contenant de la gélose BEA préchauffée (44 °C)
- Retourner la boîte et incuber à  $44 \pm 0,5$  °C pendant 2 hr

### Lecture et interprétation

- Après incubation, examiner immédiatement les membranes à la recherche de colonies d'entérocoques intestinaux (colonies brunes à noires dans le milieu environnant)

**Remarque :** la lecture peut être compliquée par la diffusion de la couleur aux colonies adjacentes

## Références

Colobert, L, and Morelis, P. (1958) New selective medium for the isolation of enterococci ; of practical use for their research and their enumeration in water. *Annals of the Institute Pasteur*, 94 (1): 120-122

Isemberg, HG, Goldbert D, and Sampson, J. (1970) Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium. *Applied Microbiology*, 20: 433-436

ISO 7899-2:2000. Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux — Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane

ISO 11133:2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture

ISO 11133/A2:2020. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture — Amendement 2

Rodier, J. (1984) Enumeration of presumptive fecal streptococcus. *Water Analysis*, 7: 827

## Historique des révisions

| Date de publication | Numéro de document | Modification  |
|---------------------|--------------------|---|
| Juillet 2021        | 5073 Ver A         | <ul style="list-style-type: none"><li>- Modification importante</li><li>- Nouvelle conception de document</li><li>- Modification du numéro de document — version précédente : V5_05-08_11</li></ul> |

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc. Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

## Bile Esculin Azide Agar (BEA)

Katalog-Nr. Beschreibung

3563994 **Bile Esculin Azide Agar BEA**), gebrauchsfertig, 20 Agarplatten x 90 mm

3564184 **Bile Esculin Azide Agar BEA**), dehydriert, 500 g

---

Nur für die Verwendung im Labor.

---

### Verwendungszweck

Selektionsagar zur Bestätigung des Nachweises und der Zählung von Enterokokken (Lancefield-Gruppe D) in Wasserproben (Membranfiltrationsverfahren). Dieses Medium kann für den Nachweis und die Zählung von *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* und *E. hirae* sowie anderer Spezies von *Enterococcus* und bestimmter Spezies der Gattung *Streptococcus* (insbesondere *S. bovis* und *S. equinus*) verwendet werden.

### Prinzip

Das Medium beruht auf der Fähigkeit von Enterokokken zur Hydrolysierung von Esculin. Das Endprodukt, Dihydroxy-6,7-cumarin, bildet mit Eisenionen eine dunkle bis schwarze Verbindung, die in das Medium diffundiert (schwarzer Hof um die Kolonien). Natriumazid und Rindergalle hemmen das Wachstum anderer Bakterien.

### Theoretische Zusammensetzung

#### Basismedium

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Trypton                         | 17 g     |
| Pepton                          | 3 g      |
| Hefeextrakt                     | 5 g      |
| Dehydrierte Rindergalle         | 10 g     |
| Natriumchlorid (NaCl)           | 5 g      |
| Esculin                         | 1 g      |
| Ammoniumeisen(III)-citrat       | 500 mg   |
| Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) | 150 mg   |
| Agar                            | 15 g     |
| Destilliertes Wasser            | 1.000 ml |

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,1 ± 0,2

### Haltbarkeit und Lagerung

Gebrauchsfertiges Medium bei 2 – 8°C lichtgeschützt lagern. Das dehydrierte Medium kühl und trocken in sorgfältig verschlossenen Flaschen bei 15 – 25°C lagern. Das aus der dehydrierten Basis hergestellte Medium kann 2 Wochen lichtgeschützt bei 2 – 8°C gelagert werden.

### Zusätzlich benötigtes Material

Diese Liste ist nicht vollständig.

#### Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Inkubatoren oder Inkubationsraum
- Waagen
- Rührer/Homogenisator
- Vortex

## Zubehör

- Pyrexflaschen mit autoklavierbarem Stopfen (125 ml/500 ml)
- Sterile Petrischalen ( $\varnothing = 55$  oder 90 mm)
- Sterile Pasteurpipetten oder Impfösen
- Slanetz & Bartley Agar (Kat.-Nr. 3563716, gebrauchsfertig, 10 Agarplatten x 55 mm; Kat.-Nr. 3563981, gebrauchsfertig, 100 Agarplatten x 55 mm; Kat.-Nr. 3564934, dehydriert, 500 g)

## Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 8199). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen lebenden Bakterien sollte angemessene Schutzkleidung wie Handschuhe und Laborkittel getragen werden.
- Medien, die mit Wasserproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen entsprechend zu entsorgen.
- Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) und das Analysezertifikat für das Produkt sind auf **bio-rad.com** erhältlich.

## Qualitätskontrolle

Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge der Fertigprodukte wird einer Qualitätskontrolle unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn die Annahmekriterien erfüllt sind. Die Unterlagen zur Produktion und Qualitätskontrolle jeder Charge werden archiviert.

## Protokoll

### Herstellung des Mediums ausgehend vom dehydrierten Basismedium

- Vor Gebrauch schütteln.
- 56,7 g Pulver in 1 L sterilem destilliertem Wasser lösen.
- 5 min warten, anschließend mischen, bis eine homogene Suspension hergestellt ist
- Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen, bis sich das Medium vollständig gelöst hat.
- Den pH-Wert bei Bedarf so einstellen, dass er nach dem Autoklavieren  $7,1 \pm 0,1$  beträgt.
- 100 ml oder 250 ml in jede Flasche geben. In einem Autoklaven 15 Minuten bei  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  sterilisieren.
- Auf  $47 \pm 2^\circ\text{C}$  abkühlen lassen. In Petrischalen gießen (Dicke 3 – 5 mm) und fest werden lassen. Dabei die Bildung von Luftblasen vermeiden.

**Rekonstitutionsverhältnis:** 56,7 g/L (500 g Pulver ergeben 8,8 L Medium)

### Probenvorbereitung

- Die Proben nach der für das jeweilige Produkt geltenden Standardmethode vorbereiten.

### Nachweis verdächtiger Darm-Enterokokken

- Die Proben nach der für das jeweilige Produkt geltenden Standardmethode vorbereiten.

### Beimpfung und Inkubation

- Slanetz & Bartley Agar gemäß ISO 7899-2 verwenden.
- Wenn auf Slanetz & Bartley Agar typische Kolonien vorhanden sind, die Membran (ohne sie umzudrehen) in eine Petrischale mit vorgewärmtem ( $44^\circ\text{C}$ ) BEA Agar überführen.
- Umgedreht 2 hr bei  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  inkubieren.

### Ablesen und Auswerten der Ergebnisse

- Die Membranen nach der Inkubation sofort auf typische Kolonien von Darm-Enterokokken (braune bis schwarze Kolonien im umgebenden Medium) überprüfen.

**Hinweis:** Das Ablesen kann bei Diffusion der Farbe in benachbarte Kolonien erschwert sein.

## Literatur

Colobert, L, and Morelis, P. (1958) New selective medium for the isolation of enterococci ; of practical use for their research and their enumeration in water. *Annals of the Institute Pasteur*, 94 (1): 120-122

Isemberg, HG, Goldbert D, and Sampson, J. (1970) Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium. *Applied Microbiology*, 20: 433-436



ISO 7899-2:2000. Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken — Teil 2: Membranfiltrationsverfahren

ISO 11133:2014. Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien.

ISO 11133/A2:2020. Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien – Änderung 2

Rodier, J. (1984) Enumeration of presumptive fecal streptococcus. Water Analysis, 7: 827

## Revisionshistorie

| Freigabedatum | Dokumentnummer | Änderung   |
|---------------|----------------|--|
| Juli 2021     | 5073 Ver A     | - Bedeutende Änderung<br>- Neues Dokumentdesign<br>- Änderung der Dokumentnummer — vorhergehende Version:<br>V5_05-08_11 |

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. Alle hierin verwendeten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

## Bile Esculin Azide Agar (BEA)

N. catalogo Descrizione

3563994 **Bile Esculin Azide Agar (BEA)**, pronto all'uso, 20 piastre da 90 mm

3564184 **Bile Esculin Azide Agar (BEA)**, in forma disidratata, 500 g

---

Esclusivamente per uso in laboratorio.

---

### Uso previsto

Agar selettivo usato per la ricerca e l'enumerazione di enterococchi (gruppo Lancefield D) in acqua (metodo della filtrazione su membrana). È possibile usare questo terreno per la ricerca e l'enumerazione di *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae* oltre ad altre specie di *Enterococcus* e alcune specie del genere *Streptococcus* (in particolare *S. bovis* e *S. equinus*).

### Principio

Il terreno si basa sulla capacità degli enterococchi di idrolizzare l'esculina. Il prodotto finale, diidrossi-6,7-cumarina, si combina con ioni di ferro per produrre un composto di colore da scuro a nero che si diffonde nel terreno (alone di colore nero intorno alle colonie). La presenza di azoturo di sodio e di bile bovina inibisce la crescita di altri batteri.

### Composizione teorica

#### Terreno di base

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Triptone                             | 17 g    |
| Peptone                              | 3 g     |
| Estratto di lievito                  | 5 g     |
| Bile bovina in forma disidratata     | 10 g    |
| Cloruro di sodio (NaCl)              | 5 g     |
| Esculina                             | 1 g     |
| Citrato ferrico di ammonio           | 500 mg  |
| Azoturo di sodio (NaN <sub>3</sub> ) | 150 mg  |
| Terreno di coltura agar              | 15 g    |
| Acqua distillata                     | 1000 ml |

pH finale a 25°C = 7,1 ± 0,2

### Durata e conservazione

Conservare il terreno pronto per l'uso a 2-8°C al riparo dalla luce. Conservare il terreno disidratato a 15-25°C in un flacone accuratamente sigillato in un luogo fresco e asciutto. Conservare i terreni preparati da base disidratata per 2 settimane a 2-8°C al riparo dalla luce.

### Materiali richiesti non in dotazione

Il presente elenco non è esaustivo.

#### Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Incubatori o camera di incubazione
- Bilance
- Agitatore/omogeneizzatore
- Vortex

### Materiali in dotazione

- Flaconi in pyrex con tappi sterilizzabili in autoclave (125 ml/500 ml)
- Piastre di Petri sterili ( $\varnothing = 55$  o 90 mm)
- Pipette Pasteur sterili o occhiali per inoculazione
- Slanetz & Bartley Agar (numero di catalogo 3563716, pronto all'uso, 10 piastre da 55 mm, numero 3563981, pronto all'uso, 100 piastre da 55 mm, numero 3564934, in forma disidratata, 500 g)

### Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 8199). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi
- I terreni entrati in contatto con campioni di acqua devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare [bio-rad.com](http://bio-rad.com)

### Controllo qualità

Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo di qualità di ciascun lotto è conservata a cura del fabbricante.

### Protocollo

#### Preparazione del terreno disidratato

- Agitare prima dell'uso
- Sciogliere 56,7 g di polvere in 1 L di acqua distillata sterile
- Attendere 5 minuti, quindi miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea
- Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione fino al completo scioglimento
- Se necessario, aggiustare il pH in modo che dopo l'impiego dell'autoclave sia  $7,1 \pm 0,1$
- Dispensare 100 ml o 250 ml per flacone. Sterilizzare in autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per 15 min
- Raffreddare a  $47 \pm 2^\circ\text{C}$ . Versare in piastre di Petri (spessore di 3-5 mm), evitando la creazione di bolle d'aria e lasciare asciugare

**Rapporto di ricostituzione:** 56,7 g/L (500 g di polvere producono 8,8 L di terreno)

#### Preparazione dei campioni

- Preparare i campioni secondo gli standard applicabili al prodotto in questione

#### Rilevamento di enterococchi intestinali sospetti

- Preparare i campioni secondo gli standard applicabili al prodotto in questione

#### Inoculazione e incubazione

- Usare l'agar Slanetz e Bartley secondo la ISO 7899-2
- Se sull'agar Slanetz e Bartley sono presenti colonie tipiche, trasferire la membrana (senza capovolgerla) in una piastra di Petri contenente agar BEA preriscaldato ( $44^\circ\text{C}$ )
- Incubare capovolgendo a  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  per 2 hr

#### Letture e interpretazione

- Dopo l'incubazione, esaminare immediatamente le membrane per individuare eventuali colonie di enterococchi intestinali tipici (colonie di colore da marrone a nero nel terreno circostante)

**Nota:** La lettura può risultare difficoltosa a causa della diffusione della colorazione alle colonie adiacenti

## Riferimenti

Colobert, L, and Morelis, P. (1958) New selective medium for the isolation of enterococci ; of practical use for their research and their enumeration in water. *Annals of the Institute Pasteur*, 94 (1): 120-122

Isemberg, HG, Goldbert D, and Sampson, J. (1970) Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium. *Applied Microbiology*, 20: 433-436

ISO 7899-2:2000. Water quality — Detection and enumeration of intestinal Enterococci — Part 2: Membrane filtration method

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

Rodier, J. (1984) Enumeration of presumptive fecal streptococcus. *Water Analysis*, 7: 827

## Cronologia delle revisioni

| Data di pubblicazione | Numero documento | Modifica   |
|-----------------------|------------------|--|
| Luglio 2021           | 5073 Ver A       | <ul style="list-style-type: none"><li>- Modifica importante</li><li>- Nuova struttura del documento</li><li>- Modifica al numero di documento – versione precedente: V5 05-08 11</li></ul> |

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà del rispettivo proprietario.

## Bile Esculin Azide Agar (BEA)

Nº catálogo Descrição

3563994 **Bile Esculin Azide Agar (BEA)**, pronto para uso, 90 mm x 20 placas

3564184 **Bile Esculin Azide Agar (BEA)**, desidratado, 500 g

---

Somente para uso em laboratório.

---

### Uso previsto

Ágar seletivo usado para confirmação na detecção e enumeração de enterococos (Lancefield grupo D) em água (método de filtração por membrana). É possível usar este meio para a detecção e enumeração de *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae*, bem como outras espécies de *Enterococcus* e certas espécies do *Streptococcus* genus (particularmente *S. bovis* e *S. equinus*).

### Princípio

O meio depende da capacidade dos enterococos de hidrolisar a esculina. O produto final, diidroxí-6,7-cumarina, combina-se com íons de ferro para produzir um composto de cor escura a preta que se difunde no meio (halo preto ao redor das colônias). A presença de azida sódica e de bile bovino inibe o crescimento de outras bactérias.

### Composição teórica

#### Meio de Base

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| Triptona                         | 17 g     |
| Peptona                          | 3 g      |
| Extrato de levedura              | 5 g      |
| Bile bovina desidratada          | 10 g     |
| Cloreto de sódio (NaCl)          | 5 g      |
| Esculina                         | 1 g      |
| Citrato férrico de amônio        | 500 mg   |
| Azida sódica (NaN <sub>3</sub> ) | 150 mg   |
| Ágar                             | 15 g     |
| Água destilada                   | 1.000 ml |
| pH Final a 25 °C = 7,1 ± 0,2     |          |

### Prazo de validade e armazenamento

Armazene o meio pronto para uso a 2–8 °C protegido da luz. Armazene o meio desidratado a 15–25 °C em frascos cuidadosamente fechados em um local fresco e seco. Armazene os meios preparados com base desidratada por 2 semanas a 2–8 °C protegidos da luz.

### Materiais necessários não fornecidos

Essa lista não é exaustiva.

#### Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Incubadoras ou sala de incubação
- Balanças
- Misturador/homogeneizador
- Agitador

### Suprimentos

- Frascos de pirex com rolhas à prova de autoclave (125ml/500ml)
- Placas de Petri estéreis ( $\varnothing = 55$  ou 90 mm)
- Pipetas Pasteur estéreis ou alças de inoculação
- Slanetz & Bartley Agar (Nº do catálogo 3563716, pronto para uso, 55 mm x 10 placas; Nº do catálogo 3563981, pronto para uso, 55 ml x 100 frascos; Nº do catálogo 3564934, desidratado, 500 g)

### Precauções

- Respeite as Boas Práticas de Laboratório (EN ISO 8199). Proteção adequada, como luvas e jalecos, deve ser usada ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas
- Os meios que tiverem entrado em contato com amostras de água devem ser considerados contaminados e devem ser descartados de acordo com as regras e regulamentos locais
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite [bio-rad.com](http://bio-rad.com)

### Controle de Qualidade

Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde o recebimento da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada.

### Protocolo

#### Preparação do Meio Desidratado

- Agite antes de usar
- Dissolva 56,7 g de pó em 1 L de água destilada estéril
- Aguarde 5 min e misture até obter uma suspensão homogênea
- Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e deixe ferver até dissolver completamente
- Se necessário, ajuste o pH para que, após o autoclave, seja de  $7,1 \pm 0,1$
- Dispense 100 ml ou 250 ml por frasco. Esterilize em autoclave a  $121 \pm 3$  °C por 15 min
- Resfrie a  $47 \pm 2$  °C. Despeje em placas de Petri (3–5 mm de espessura), evitando a criação de bolhas de ar e deixe secar

**Taxa de reconstituição:** 56,7 g/L (500 g de pó faz 8,8 L de meio)

#### Preparação da amostra

- Prepare amostras de acordo com os padrões para o produto em questão

#### Deteção de Enterococos Intestinais Suspeitos

- Prepare amostras de acordo com os padrões para o produto em questão

#### Inoculação e Incubação

- Use ágar Slanetz e Bartley de acordo com ISO 7899-2
- Se colônias típicas estiverem presentes no ágar Slanetz e Bartley, transfira a membrana (sem virá-la) para uma placa de Petri de ágar BEA pré-aquecido (44 °C)
- Incube invertida a  $44 \pm 0,5$  °C por 2 hr

#### Leitura e Interpretação

- Após a incubação, examine imediatamente as membranas em busca de colônias enterocócicas intestinais típicas (colônias marrons a pretas no meio circundante)

**Nota:** A leitura pode ser dificultada pela difusão da cor para as colônias adjacentes

## Referências

Colobert, L, and Morelis, P. (1958) New selective medium for the isolation of enterococci; of practical use for their research and their enumeration in water. *Annals of the Institute Pasteur*, 94 (1): 120-122

Isemberg, HG, Goldbert D, and Sampson, J. (1970) Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium. *Applied Microbiology*, 20: 433-436

ISO 7899-2:2000. Water quality — Detection and enumeration of intestinal Enterococci — Part 2: Membrane filtration method

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

Rodier, J. (1984) Enumeration of presumptive fecal streptococcus. *Water Analysis*, 7: 827

## Histórico de Revisão

| <b>Data de lançamento</b> | <b>Número do documento</b> | <b>Alteração</b>  |
|---------------------------|----------------------------|---|
| Julho de 2021             | 5073 Ver A                 | <ul style="list-style-type: none"><li>- Alteração importante</li><li>- Novo design de documento</li><li>- Alteração do número do documento — versão anterior: V5 05-08 11</li></ul> |

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.

## Bile Esculin Azide Agar (BEA)

### Referencia # Descripción

3563994 **Bile Esculin Azide Agar (BEA)**, listo para el uso, 90 mm x 20 placas  
3564184 **Bile Esculin Azide Agar (BEA)**, deshidratado, 500 g

---

Sólo para uso en laboratorio.

---

### Uso previsto

Agar selectivo utilizado para la confirmación en la detección y recuento de enterococos (grupo D de Lancefield) en agua (método de filtración por membrana). Es posible utilizar este medio para la detección y el recuento de *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*, así como de otras especies de *Enterococcus* y de algunas especies del género *Streptococcus* (especialmente *S. bovis* y *S. equinus*).

### Principio

El medio se basa en la capacidad de los enterococos para hidrolizar la esculina. El producto final, la dihidroxi-6,7-cumarina, se combina con los iones de hierro para producir un compuesto de color oscuro a negro que se difunde en el medio (halo negro alrededor de las colonias). La presencia de azida sódica y bilis bovina inhibe el crecimiento de otras bacterias.

### Composición teórica

#### Medio base

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| Triptona                         | 17 g     |
| Peptona                          | 3 g      |
| Extracto de levadura             | 5 g      |
| Bilis bovina deshidratada        | 10 g     |
| Cloruro de sodio (NaCl)          | 5 g      |
| Esculina                         | 1 g      |
| Citrato de amonio férrico        | 500 mg   |
| Azida sódica (NaN <sub>3</sub> ) | 150 mg   |
| Agar                             | 15 g     |
| Agua destilada                   | 1.000 ml |

pH final a 25 °C = 7,1 ± 0,2

### Vida útil y almacenamiento

Almacenar el medio listo para su uso a 2-8 °C protegido de la luz. Almacenar el medio deshidratado a 15-25 °C en frascos bien cerrados en un lugar fresco y seco. Almacenar el medio preparado a partir de la base deshidratada durante 2 semanas a 2-8 °C protegido de la luz.

### Materiales necesarios, pero no suministrados

Esta lista no es exhaustiva.

#### Equipos

- Todo el equipo habitual del laboratorio
- Incubadoras o sala de incubación
- Balanzas
- Agitador/homogeneizador
- Vórtex



### Fungibles

- Frascos de Pyrex con tapones resistentes a la esterilización en autoclave (125 ml/500 ml)
- Placas de Petri estériles ( $\varnothing = 55$  o 90 mm)
- Asas de inoculación o pipetas Pasteur esterilizadas
- Slanetz & Bartley Agar (referencia #3563716, listo para usar, 55 mm x 10 placas; #3563981, listo para usar, 55 mm x 100 placas; #3564934, deshidratado, 500 g)

### Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 8199). Usar protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas
- Los medios que han estado en contacto con muestras de agua deben considerarse contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales
- Visite [bio-rad.com](http://bio-rad.com) para obtener información de seguridad del producto (SDS) y certificados de análisis

### Control de calidad

Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos terminados. Cada lote de producto terminado se somete a un control de calidad y su comercialización está condicionada a que cumpla los criterios de aceptabilidad. La documentación relativa a la producción y al control de calidad de cada lote se mantiene archivada.

### Protocolo

#### Preparación del medio deshidratado

- Agitar antes de usar
- Disolver 56,7 g de polvo en 1 L de agua destilada estéril
- Esperar 5 minutos y a continuación mezclar hasta obtener una suspensión homogénea
- Calentar suavemente, agitando frecuentemente, y luego llevar a ebullición hasta que se disuelva completamente
- Si es necesario, ajustar el pH para que después del autoclave sea de  $7,1 \pm 0,1$
- Dispensar 100 ml o 250 ml por frasco. Esterilizar en autoclave a  $121 \pm 3$  °C durante 15 min
- Enfriar a  $47 \pm 2$  °C. Verter en placas de Petri (de 3-5 mm de espesor), evitando la formación de burbujas de aire y dejar secar

**Proporción de reconstitución:** 56,7 g/L (con 500 g de polvo se obtienen 8,8 L de medio)

#### Preparación de las muestras

- Preparar las muestras según los estándares aplicables al producto en cuestión

#### Detección de enterococos intestinales sospechosos

- Preparar las muestras según los estándares aplicables al producto en cuestión

#### Inoculación e incubación

- Utilizar el agar Slanetz y Bartley según la norma ISO 7899-2
- Si hay colonias típicas presentes en el agar Slanetz y Bartley, transferir la membrana (sin voltearla) a una placa de Petri con agar BEA precalentado (44 °C)
- Incubar invertido a  $44 \pm 0,5$  °C durante 2 hr

#### Lectura e interpretación

- Después de la incubación, examinar inmediatamente las membranas en busca de colonias típicas de enterococos intestinales (colonias de color marrón a negro en el medio circundante)

**Nota:** La lectura puede verse dificultada por la difusión del color a las colonias adyacentes

## Referencias

Colobert, L, and Morelis, P. (1958) New selective medium for the isolation of enterococci ; of practical use for their research and their enumeration in water. *Annals of the Institute Pasteur*, 94 (1): 120-122

Isemberg, HG, Goldbert D, and Sampson, J. (1970) Laboratory studies with a selective *Enterococcus* medium. *Applied Microbiology*, 20: 433-436

ISO 7899-2:2000. Water quality — Detection and enumeration of intestinal Enterococci — Part 2: Membrane filtration method

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

Rodier, J. (1984) Enumeration of presumptive fecal streptococcus. *Water Analysis*, 7: 827

## Historial de revisiones

| Fecha de publicación | N.º de documento | Cambio   |
|----------------------|------------------|--|
| Julio 2021           | 5073 Ver A       | <ul style="list-style-type: none"><li>- Cambio significativo</li><li>- Nuevo diseño del documento</li><li>- Cambio en el número de documento – versión anterior: V5 05-08 11</li></ul> |

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.