

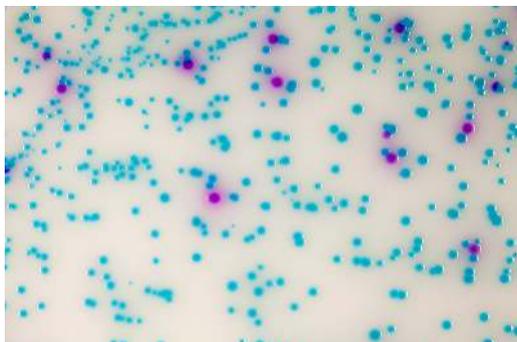


ISTRUZIONI PER L'USO

ChromArt

CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR

Piastre pronte all'uso



Chromogenic Salmonella Agar:
coltura mista di *Salmonella* sp. (colonie porpora)
e di *E. aerogenes* (colonie verde-azzurre)

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e cromogeno per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *Salmonella*, da campioni clinici e non clinici

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptone	10,0 g
Miscela di inibitori	12,0 g
Miscela di cromogeni	0,9 g
Agar	15,0 g
Opacizzante	10,0 g
Emulsionanti	11,4 ml
Cefsulodina	5,0 mg
Acqua purificata	1000 ml

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Salmonella rimane una delle cause più importanti di gastroenterite di origine alimentare e da almeno 30 anni sono disponibili test e terreni di coltura fluorogeni e cromogeni, sviluppati per la sua rilevazione specifica. Nel 1987 è stato sviluppato e proposto da Biolife Italiana un test rapido di screening, il MUCAP Test, per l'identificazione delle colonie di *Salmonella*, basato sulla determinazione di uno specifico enzima prodotto da *Salmonella*, la C₈ esterasi, utilizzando un substrato coniugato con il fluoroforo 4-metilumbelliferone.¹ Alcuni anni dopo, lo stesso principio di rilevazione dell'esterasi è stato sfruttato per lo sviluppo di un terreno di coltura cromogeno, il Chromogenic Salmonella Agar, che ha dimostrato una elevata specificità e sensibilità nella determinazione di *Salmonella* spp.^{2,3}

Chromogenic Salmonella Agar è un terreno selettivo e diagnostico utile per l'isolamento di *Salmonella* spp. da campioni clinici e non clinici e per l'identificazione presuntiva delle colonie. Il terreno è citato dal rapporto ISTISAN 05/27 tra i vari terreni in piastra per l'isolamento di *Salmonella* spp.⁴ ed i terreni cromogeni sono inclusi nelle norme ISO per determinare *Salmonella* nelle acque e negli alimenti^{5,6}. I peptoni forniscono carbonio, azoto, vitamine e oligoelementi per la crescita batterica. I composti selettivi incorporati nel mezzo sono: cefsulodina, una cefalosporina di terza generazione che ha un'attività inibitoria molto specifica verso *P. aeruginosa* e *S.aureus*, desossicolato di sodio che sopprime la crescita dei batteri Gram-positivi e di alcuni batteri Gram-negativi, Tergitol 4, attivo principalmente contro la crescita di *Proteus* spp.

La differenziazione di *Salmonella* dagli altri organismi che possono crescere sul terreno è ottenuta con:

- la presenza di un substrato cromogeno (magenta caprilato) sul quale agisce una esterasi specifica di *Salmonella* con liberazione di un metabolita color rosso magenta.
- la presenza di un derivato cromogeno glucopiranosidico sul quale agisce la β -glucosidasi con liberazione di un metabolita color verde-blu.

Alcune *Enterobacteriaceae*, tra cui *Klebsiella* ed *Enterobacter*, ma non *Salmonella*, sono β -glucosidasi positive e, se crescono, formeranno colonie blu-verdi o blu scuro, anche nel caso fossero esterasi positive, che le rendono facilmente differenziabili da *Salmonella* che coltiva con colonie rosso-magenta. Il sistema selettivo/differenziale del terreno consente di determinare anche i rari ceppi di *Salmonella* fermentanti il lattosio che sui terreni tradizionali e su altri terreni cromogeni non sono evidenziabili. Il terreno consente l'isolamento e l'identificazione presuntiva anche di S.Typhi. Il fondo opaco biancastro del terreno pronto in piastra permette una migliore differenziazione dei colori delle colonie.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in piastra
pH finale a 20-25°C

biancastro, opaco
7,2 \pm 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Salmonella Agar	Piastre pronte all'uso	545350	2 x 10 piastre \varnothing 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Chromogenic Salmonella Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tampone rettale e campioni non clinici. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni clinici.⁷ Consultare le norme applicabili per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni alimentari e delle acque.^{5,6}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno. Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate assicurandosi che la semina sul quarto quadrante





non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Il massimo recupero di *Salmonella* dai campioni fecali si ottiene utilizzando un arricchimento in Selenite Broth seguito dalla semina in Chromogenic Salmonella Agar ed in un secondo terreno a selettività più bassa.

Incubare le piastre di Chromogenic Salmonella Agar, inoculate con il campione o con il campione arricchito in terreno liquido, in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore.

Consultare le norme citate, per la determinazione di *Salmonella* negli alimenti e nelle acque.^{5,6}

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie isolate. I diversi microrganismi coltivano su Chromogenic Salmonella Agar con le seguenti caratteristiche:

Microrganismo	Caratteristiche colturali
<i>Salmonella</i> spp.	buona crescita colonie color magenta
<i>Salmonella</i> spp. lac +	buona crescita colonie color magenta
<i>Salmonella</i> Typhi	buona crescita colonie color magenta
<i>E.coli</i>	crescita scarsa con colonie incolori
<i>Enterobacter</i> spp.	crescita scarsa con colonie verde-blu
<i>Klebsiella</i> spp.	crescita scarsa con colonie verde-blu
<i>Pseudomonas</i> spp	crescita generalmente inibita
<i>Proteus</i> spp.	crescita scarsa con colonie marrone chiaro
Batteri Gram positivi	crescita inibita

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T°/ t / ATM)	RISULTATI ATTESI
S. Typhimurium ATCC 14028	35°- 37°C / 24 h / A	buona crescita, colonie color magenta
S. Enteritidis ATCC 13076	35°- 37°C / 24 h / A	buona crescita, colonie color magenta
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	35°- 37°C / 24 h / A	crescita, colonie verdi-blu
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	35°- 37°C / 24 h / A	crescita inibita

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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Chromogenic Salmonella Agar è stato valutato da Babic-Ergeg et al.² su 3000 coproculture, delle quali 45 positive per *Salmonella*, avendo come riferimento il terreno SS Agar. Gli autori riportano una sensibilità del 100% ed una specificità del 99% nell'isolamento e nell'identificazione preliminare delle colonie di *Salmonella*.

In un altro studio indipendente³, 50 ceppi d'isolamento clinico di *Salmonella*, in coltura pura, hanno dato tutti reazioni cromatiche specifiche; tra gli altri 80 ceppi di batteri Gram negativi testati non appartenenti al genere *Salmonella*, 3 ceppi su 3 di *P.aeruginosa* e 1 ceppo su 3 di *A.baumannii* hanno fornito risultati cromatici simili a *Salmonella* spp.(colonie rosso-rosa), i restanti 76 ceppi di *Enterobacteriaceae* hanno dato reazioni cromatiche non tipiche; 20 ceppi su 20 di batteri Gram positivi sono stati totalmente inibiti.

Le prestazioni del Chromogenic Salmonella Agar sono state valutate con uno studio interno, confrontando le piastre di agar cromogeno selettivo con Hektoen Enteric Agar. Produttività, selettività e specificità sono state valutate con tecnica ecometrica semiquantitativa, incubando a 35-37 ° C per 18-24 ore, usando 43 ceppi batterici: 8 ceppi target e 35 ceppi non target. 8 ceppi di *Salmonella*, inclusi 2 ceppi di *S.Typhi*, hanno mostrato una buona crescita con colonie rosso magenta; 3 ceppi di *Shigella* hanno mostrato una crescita più scarsa rispetto a HEA con colonie incolori; 22 ceppi di *Enterobacteriaceae* appartenenti a 9 diversi generi hanno mostrato una crescita più scarsa rispetto a HEA con colonie incolori o blu-verdi; 4 ceppi di *P.aeruginosa* sono stati totalmente inibiti; 2 ceppi di batteri non fermentanti sono stati totalmente inibiti e *A.hydrophila* è cresciuta con colonie rosso magenta; 1 ceppo Gram-positivo è stato totalmente inibito e 1 ceppo di lievito è stato parzialmente inibito mostrando colonie incolori.

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte all'uso di Chromogenic Salmonella Agar e delle materie prime impiegate per la produzione (terreno in polvere Chromogenic Salmonella Agar REF 405350, addizionato di Salmonella Selective Supplement REF 4240013) vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di piastre pronte all'uso di Chromogenic Salmonella Agar e della materia prima utilizzata per la produzione delle piastre pronte all'uso (terreno in polvere Chromogenic Salmonella Agar Base REF 405350 addizionato di Chromogenic Salmonella Supplement REF 4240013) sono testati per la produttività, la specificità e la selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività è testata con metodo quantitativo con i ceppi target *S.Enteritidis* ATCC 13076 e *S.Typhimurium* ATCC 14028; le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie ed incubate a 35-37°C per 18-24 ore. Le colonie sono contate sul Test Batch (TB) e sul Reference Batch (RB) e viene calcolato il rapporto di produttività ($Pr = UFC_{TB} / UFC_{RB}$). Se $Pr \geq 0,7$ e se il colore delle colonie è tipico (colonie rosso magenta) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità viene valutata con tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi non target: *S.flexneri* ATCC 12022, *E.aerogenes* ATCC 13048, *E.coli* ATCC 8739; *E.aerogenes* non è inibito e cresce con colonie blu-verdi, la crescita di *S.flexneri* non è inibita e le colonie sono incolori, *E.coli* è parzialmente inibito con colonie incolori. La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con diluizioni decimali in soluzione salina da 10^{-1} a 10^{-4} di una sospensione 0,5 McFarland dei ceppi non target *P.vulgaris* ATCC 13315, *A.calcoaceticus* ATCC 19606, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *A.hydrophila* ATCC 7965 *E.faecalis* ATCC 19433, *Mucor* CBM1. *A.hydrophila* è parzialmente inibita e sviluppa colonie color magenta, la crescita degli altri ceppi non target è totalmente inibita alla diluizione 10^{-1} .



**12 - LIMITI DEL METODO**

- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. È necessario pertanto utilizzare, insieme a Chromogenic Salmonella Agar, terreni aggiuntivi per l'isolamento di *Salmonella*, con selettività inferiore, come Mac Conkey Agar; è consigliabile anche la semina del campione su altri terreni culturali specifici per altri patogeni enterici.
- Sul terreno possono coltivare, con colonie rosso-rosa, ceppi di *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ed *Aeromonas* resistenti agli agenti antimicrobici del terreno, differenziabili da *Salmonella* con il test dell'ossidasi.
- Il tasso di crescita sulle piastre dipende anche dalle richieste nutrizionali delle salmonelle. È possibile che certi ceppi con particolari caratteristiche metaboliche non crescano sul terreno o crescono privi di colore (es. *Salmonella enterica* serovar Dublin cresce con colonie bianche).
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- La singola piastra del prodotto qui descritto 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, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. 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, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Pontello M, Russolo S, Carozzi F, Bottiroli U. Evaluation of a new rapid method (MUCAP Test) for the presumptive identification of Salmonella on primary isolation media. 5th Int. Simp. on Rapid Method and Aut. in Microb. and Immunol. Florence 4-6 nov. 1987
2. Babic-Erceg A et al. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Milan, April 24-27, 2002
3. Andreoni S. et al. Microbiologia Medica, 2002.
4. Istituto Superiore di Sanità Le infezioni da Salmonella: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. Caterina Graziani, Pasquale Galetta, Luca Busani, Anna Maria Dionisi, Emma Filetici, Antonia Ricci, Alfredo Caprioli, Ida Luzzi 2005, 49 p. Rapporti ISTISAN 05/27
5. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella.
6. ISO19250:2010 Water quality — Determination of Salmonella species
7. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

