

## ISTRUZIONI PER L'USO

ChromArt

**CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR BASE**  
**SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT**  
Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo

CSA: a sinistra: *Salmonella* sp. con colonie rosso magenta, a destra *E. aerogenes* con colonie verde-blu

**1 - DESTINAZIONE D'USO**

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

**2 - COMPOSIZIONE****CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR BASE****Formula tipica (per litro, dopo scioglimento in acqua)\* \***

Peptone	10,0 g
Miscela di inibitori	12,0 g
Miscela di cromogeni	0,9 g
Agar	15,0 g

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

**SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT****Salmonella Selective Supplement, Vial A****Contenuto della fiala per 500 mL di terreno**

Emulsionanti 5,7 mL

**Salmonella Selective Supplement, Vial B****Contenuto della fiala per 500 mL di terreno**

Cefsulodina 2,5 mg

**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 C<sub>8</sub> esterasi, utilizzando un substrato coniugato con il fluoroforo 4-metilumbelliferone.<sup>1</sup> 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.<sup>2,3</sup> Chromogenic Salmonella Agar addizionato di Chromogenic Salmonella Supplement 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.<sup>4</sup> ed i terreni cromogeni sono inclusi nelle norme ISO per determinare *Salmonella* nelle acque e negli alimenti<sup>5,6</sup>.

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 e 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 terreno pronto in piastra è preparato senza opacizzante e si presenta quindi limpido.

**4 - METODO DI PREPARAZIONE**

Sospendere 19 g di terreno in 500 mL di acqua purificata fredda; aggiungere il contenuto di un flacone di Salmonella Selective Supplement, Vial A (cod.4240013). Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47°C-50°C ed aggiungere il contenuto di una fiala di Salmonella Selective Supplement, Vial B (cod.4240013), ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile. Mescolare con cura e distribuire in piastre di Petri.

**5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO****Chromogenic Salmonella Agar Base**

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	giallastro opalescente
pH finale a 25 °C	7,2 ± 0,2

**Salmonella Selective Supplement, Vial A**





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 incolore; 22 ceppi di *Enterobacteriaceae* appartenenti a 9 diversi generi hanno mostrato una crescita più scarsa rispetto a HEA con colonie incolore 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 incolore

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Chromogenic Salmonella Agar Base, addizionato di Salmonella Selective Supplement vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è testata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i ceppi target *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028. Dopo incubazione a 35-37 ° C per 18-24 ore, vengono valutati e registrati il colore delle colonie e l'entità delle crescite.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non target: *E.faecalis* ATCC 292012, *E.aerogenes* ATCC 13048, *E.coli* ATCC 8739, *P.vulgaris* ATCC 13315, *A.calcoaceticus* ATCC 19606, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *A.hydrophila* ATCC 7965. La crescita dei ceppi non-target *E.faecalis*, *P.vulgaris*, *P.aeruginosa*, *A.calcoaceticus*, *A.hydrophila* è inibita alla diluizione 10<sup>-1</sup>, la crescita di *E.aerogenes* è leggermente inibita, la crescita di *E.coli* è parzialmente inibita. Le colonie dei ceppi non-target mostrano il tipico colore blu-verde o sono incolore, come da specifiche.

### 13 - 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 al terreno qui descritto, 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.

### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo, 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.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato.
- I terreni in polvere ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra ed in flacone.
- Il supplemento qui descritto è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica dei flaconi dei supplementi per evitare lesioni.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://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.

### 15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

**Terreno in polvere:** Conservare a +2°C /+8°C al riparo della luce e dell'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, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

**Supplementi selettivi:** 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; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto liofilo ed il prodotto ricostituito al momento dell'uso e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).





L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del supplemento e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

**16 - 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**

<b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	<b>LOT</b> Numero di lotto	<b>IVD</b> Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta	

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 9	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 10	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	01/2022

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

