

**ISTRUZIONI PER L'USO****BISMUTH SULPHITE AGAR**

Terreno di coltura in polvere

Bismuth Sulphite Agar: colonie di *Salmonella* Enteritidis**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno altamente selettivo per l'isolamento di microrganismi appartenenti al genere *Salmonella*, specialmente *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, da campioni clinici ed altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE**FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA)***

Estratto di carne	5,000 g
Triptone	5,000 g
Peptone	5,000 g
Glucosio	5,000 g
Sodio fosfato bibasico	4,000 g
Indicatore bismuto solfito	8,000 g
Ferro solfato	0,300 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20,000 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Bismuth Sulphite Agar è una modifica della formulazione originale ideata da Wilson e Blair.^{1,2} È destinato all'isolamento di *Salmonella enterica* serovar Typhi e di altre salmonelle da campioni clinici,^{3,4} alimenti,^{5,6} acque⁷ e da altri materiali sospettati di contenere questi patogeni. Il terreno è altamente selettivo ed è adatto alla semina di campioni fortemente contaminati. L'uso di questo terreno può essere particolarmente utile per l'isolamento di ceppi di salmonelle che fermentano il lattosio.

Il bismuto solfito che precipita nel terreno per azione del calore, è responsabile delle proprietà inibitorie verso i coliformi, in presenza di glucosio e di un eccesso di solfito di sodio.² L'azione selettiva del terreno verso i batteri Gram-positivi è potenziata dalla presenza del verde brillante.² Il ferro solfato è un indicatore della formazione di idrogeno solforato: la riduzione del bismuto solfito, in ambiente acido creatosi per la fermentazione del glucosio, si traduce nella produzione di idrogeno solforato che, reagendo con il sale di ferro, precipita sotto forma di ferro solfuro. Questa reazione si traduce nella formazione di colonie nere e di un precipitato marrone o nero, mentre la riduzione degli ioni bismuto a bismuto metallico produce una lucentezza metallica intorno alle colonie. L'annerimento della colonia e la formazione della lucentezza metallica non si verificano se le colonie sono troppo piccole (nella zona della piastra dove la crescita è molto compatta) e se il mezzo diventa troppo acido.³ I peptoni sono una fonte di azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita batterica; il glucosio è una fonte di energia; il sodio fosfato bibasico limita l'eccesso di acidità che si forma durante lo sviluppo delle colonie; l'agar è l'agente solidificante.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 52 g in 1000 mL di acqua purificata fredda e mescolare accuratamente. Riscaldare agitando frequentemente fino all'ebollizione e bollire per 30-60 secondi per sciogliere l'agar e ottenere una sospensione uniforme (il precipitato non si dissolve). Raffreddare a 50-55°C, mescolare delicatamente per disperdere uniformemente il precipitato e versare in piastre di Petri sterili (25 mL di terreno per piastra). Lasciare solidificare il terreno con le piastre aperte. Non surriscaldare, non autoclavare, non ridisciogliere il terreno dopo la preparazione. Utilizzare le piastre non oltre le 48 ore dalla preparazione, conservandole al buio, a temperatura ambiente ed evitando un'eccessiva essiccazione.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere
Aspetto del terreno in piastra
pH finale a 25 °C

fine granulometria omogenea, verde chiaro
da verde chiaro a paglierino, omogeneamente opaco
7,7 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Bismuth Sulphite Agar	Terreno in polvere	40121022	500 g (9,6 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Bismuth Sulphite Agar è destinato alla semina di campioni clinici come feci, tamponi rettali, urine e campioni non clinici come alimenti e acqua. Il terreno può essere seminato con le feci sospese in soluzione fisiologica o in altro terreno liquido di trasporto oppure con il campione fecale arricchito in un appropriato brodo selettivo. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.⁸ Per la raccolta dei campioni non di origine clinica fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.^{5,6,7}





9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Campioni clinici

Strisciare il campione con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su un'area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare in aerobiosi a 35-37°C per 48 ore. Esaminare dopo 24 ore per la presenza di colonie tipiche. Se le piastre mostrano poca o nessuna crescita dopo 24 ore, incubare altre 18-24 ore.

Sintesi del metodo per gli alimenti riportato da ISO 6579-1, Annex D

Pre-arricchimento non selettivo in Buffered Peptone Water, incubazione 34-38 °C per 18 ore.

Arricchimento selettivo aggiuntivo, oltre a MKTTn e RVS, in Selenite Cystine Broth con incubazione a 37°C per 24 e 48h. Trapianto in Bismuth Sulphite Agar e in XDL Agar, incubazione a 37 °C per 24-48 ore.

Osservazione delle piastre a 24 e 48 ore per rilevare la presenza di colonie tipiche, da sottoporre a test di conferma.

Per una trattazione dettagliata del metodo si rimanda alla norma in vigore.⁷

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le principali caratteristiche delle colonie su Bismuth Sulphite Agar sono riportate qui di seguito.

Salmonella Typhi: colonie ad "occhio di coniglio", rotonde, piatte, nere, alle 18 ore circondate da una zona brunastra o nera con o senza riflessi metallici; dopo 48 ore le colonie sono uniformemente nere con alone marrone-nero marcato.

Salmonella Paratyphi A ed altre salmonelle: morfologia variabile delle colonie dopo 18 ore: possono essere nere, verdi o chiare e mucoidi. Le colonie uniformemente nere si osservano dopo 48 ore, spesso con una colorazione diffusa del mezzo e una lucentezza metallica pronunciata.

Shigella spp.: inibite ma alcuni ceppi (*S.flexneri* e *S.sonnei*) possono crescere come colonie verde-marrone.

Altri organismi come coliformi, *Serratia*, *Proteus*: di norma inibiti, ma ceppi occasionali danno colonie opache verdi o marroni senza lucentezza metallica o colorazione del terreno circostante.

Sebbene *S.Typhi* possa crescere entro le 24 ore, la lettura finale delle caratteristiche delle colonie deve essere fatta dopo 48 ore di incubazione.

11 - 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	INCUBAZIONE	SPECIFICHE
S. Typhimurium ATCC 14028	35-37 °C x 24-48 h/A	colonie marroni/ grigie/ nere, con o senza riflessi metallici alle 24 h.
S. Enteritidis ATCC 13076	35-37 °C x 24-48 h/A	colonie verdi/ marroni/nere, con o senza riflessi metallici alle 24 h.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37 °C x 48 h/A	parzialmente inibito, colonie verde e marrone chiaro senza riflessi metallici
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	35-37 °C x 48 h/A	crescita inibita

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

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Bismuth Sulphite Agar vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento

La produttività è saggiata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *S.enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *S.enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *S.enterica* subsp. *arizonae* ATCC 13314, ed un ceppo di *S.enterica* subsp. *enterica* serovar Derby d'isolamento clinico. Dopo incubazione a 35-37°C per 24-48 ore, viene valutata e registrata l'entità delle crescite e le caratteristiche cromatiche delle colonie: esse devono essere comparabili in entrambi i lotti ed in accordo alle specifiche.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non-target *E.coli* ATCC 25922, *P.vulgaris* ATCC 9484, *E.aerogenes* ATCC 13048, *E.faecalis* ATCC 19433. *E.faecalis* risulta totalmente inibito mentre la crescita degli altri ceppi non target è parzialmente inibita.

13 - LIMITI DEL METODO

- Conservare il flacone del terreno in polvere ben chiuso al buio poiché la polvere tende a deteriorarsi rapidamente se esposta all'atmosfera; il deterioramento è indicato dalla formazione di aggregati non friabili e da un colore brunastro della polvere; una volta sciolta in acqua la polvere deteriorata forma una soluzione marrone invece che verde chiaro e perde le proprie caratteristiche differenziali e di selettività.
- Un riscaldamento prolungato del terreno in fase di preparazione ne diminuisce la selettività.
- Bismuth Sulphite Agar in piastra non deve essere conservato per più di 2 giorni. Dopo 3 giorni di conservazione il terreno diventa di colore verde con riduzione della selettività, con conseguente minor numero di salmonelle recuperate. Preferibilmente, il terreno dovrebbe essere usato il giorno della preparazione e non conservato.^{3,5-7}
- È importante seminare strisciando bene l'inoculo per avere colonie ben isolate sul terreno, per evidenziare lo sviluppo di idrogeno solforato ed il caratteristico riflesso metallico; ove le crescite sono confluenti il colore delle colonie appare verde chiaro e questo può indurre ad errate interpretazioni dei risultati.³
- Se l'inoculo di campioni organici è troppo pesante possono svilupparsi colonie atipiche; per evitare ciò è consigliabile sospendere il campione in fisiologica, centrifugare ed inoculare il soprannatante.³
- Le colonie su Bismuth Sulphite Agar possono essere contaminate da altri microrganismi vitali e le colonie isolate dovrebbero essere sottoposte a subcoltura su un terreno meno selettivo (per esempio, MacConkey agar).³
- Non autoclavare; il riscaldamento per un periodo più lungo del necessario riduce la selettività del terreno.³
- Bismuth Sulphite Agar può essere inibitorio per alcuni ceppi di *Salmonella* e quindi non dovrebbe essere usato come unico terreno selettivo per questi patogeni ma usato insieme ad altri terreni enterici meno selettivi (XLD Agar, Brilliant Green Agar, SS Agar, Hektoen Enteric Agar).





- 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

- Il terreno 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.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza
- Il terreno in polvere qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante e post mortem* sugli animali e quelli durante il processo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto qui descritto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, in provetta o in fialone.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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

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 fialone 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). Il terreno in piastra deve essere preparato fresco, appena prima dell'uso o conservato a temperatura ambiente per non più di 2 giorni. L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno.

16 - BIBLIOGRAFIA

- Wilson JW, Blair EM. Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of *B.typhosus* and *B.proteus*. 1927; J Hyg 26:374
- Wilson JW, Blair EM. Further experience of the bismuth sulphite media in the Isolation of *Bacillus typhosus* and *B. paratyphosus B* from faeces, sewage and water. 1931; J Hyg 31:138
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- Atlas R, Snyder J. Reagents, Stains and Media: Bacteriology. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019
- ISO 6579:2017/ ISO ISO 6579:2017 Amd1:2020. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: *Salmonella*. Content current as of: 03/18/2022
- ISO 19250:2010 Water quality — Detection of *Salmonella* spp
- McElvania E, Singh K. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.

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	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

