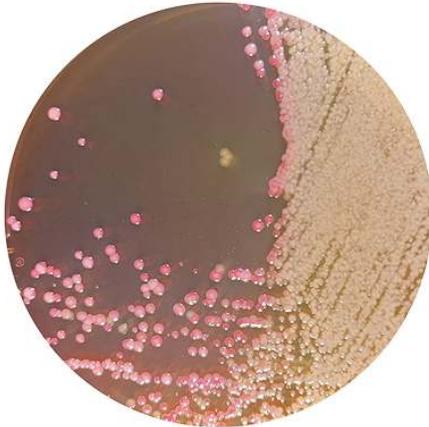


**ISTRUZIONI PER L'USO****DESOXYCHOLATE AGAR**

Terreno in polvere

Desoxycholate Agar: *K.pneumoniae* (colonie rosa-rosse), *S.Enteritidis* (colonie color crema)**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno moderatamente selettivo per l'isolamento e la differenziazione dei batteri enterici Gram negativi da campioni clinici e per il conteggio dei coliformi nei prodotti lattiero caseari.

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

Peptocomplex	10,000 g
Lattosio	10,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Potassio fosfato bibasico	2,000 g
Ferro citrato	1,000 g
Sodio citrato	1,000 g
Sodio desossicolato	1,000 g
Rosso neutro	0,033 g
Agar	15,000 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Desoxycholate Agar, preparato sulla base della formulazione descritta da Leifson¹ nel 1935, è indicato per l'isolamento e la differenziazione dei batteri enterici Gram negativi da una varietà di campioni clinici² e per il conteggio dei coliformi nei prodotti lattiero caseari³.

La miscela di peptoni Peptocomplex fornisce azoto e carbonio per la crescita microbica; il potassio fosfato agisce da sistema tampone, il sodio cloruro da equilibratore osmotico; la moderata selettività del terreno è dovuta alla presenza del sodio desossicolato, del sodio citrato e del ferro citrato che permettono una buona crescita dei batteri Gram negativi ed una inibizione da parziale a totale dei batteri Gram positivi. Il lattosio è inserito nel terreno come carboidrato fermentabile, il rosso neutro come indicatore di pH: i coliformi fermentano il lattosio producendo una acidificazione del terreno attorno alla colonia evidenziata dalla precipitazione del sodio desossicolato e dallo sviluppo di una colorazione rossa; i batteri che non fermentano il lattosio (tra cui i patogeni enterici *Salmonella* e *Shigella*) non acidificano il terreno di coltura e coltivano con colonie incolori.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 45 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, raffreddare a 47-50°C e distribuire in piastre sterili. Non sterilizzare in autoclave e non eccedere nel riscaldamento.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige-rosata
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	limpido, rosso-viola
pH (20-25°C)	7,2 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Desoxycholate Agar	Terreno di coltura in polvere	4013702	500 g (11,1 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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

8 - CAMPIONI

Possano essere utilizzati campioni clinici sui quali ricercare e differenziare i batteri enterici Gram negativi, quali le feci. Per i campioni alimentari fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili. Seguire le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI**Campioni clinici⁴**

Ruotare il tampone con il quale è stato raccolto il campione clinico su un'area ristretta della piastra, quindi strisciare su quattro quadranti della piastra per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. Incubare a 35-37°C per 24 ore in aerobiosi. In caso di assenza di crescita microbica incubare per ulteriori 24 ore

Conteggio dei coliformi nei prodotti lattiero caseari³

- Introdurre 1-4 ml di campione (o diluizione decimale dello stesso) in una piastra sterile.
- Aggiungere alla piastra 10-20 ml di terreno raffreddato a 47-50°C e mescolare bene.
- Lasciare solidificare il terreno e versare uno strato superficiale di copertura di 3-4 ml di Desoxycholate Agar non inoculato.
- Incubare 18-24 ore a 35-37° C.





10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Batteri enterici Gram negativi non fermentanti il lattosio: colonie incolori

Batteri enterici Gram negativi fermentanti il lattosio (coliformi): colonie rosse a volte circondate da una zona opaca rosa-rossa (precipitazione del sodio desossicolato).

11 - CONTROLLO QUALITA'

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 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
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24 H / A	crescita, colonie rosso-viola
<i>S.Enteritidis</i> ATCC 13076	35-37°C / 18-24 H / A	crescita, colonie incolori
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	35-37°C / 18-24 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 Desoxycholate Agar sono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con 7 ceppi target Gram negativi: *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 8739, *E.aerogenes* ATCC 13048, *S.Enteritidis* ATCC 13076, *P.vulgaris* ATCC 8427, *P.aeruginosa* ATCC 14207. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h ore in aerobiosi si osservano le caratteristiche cromatiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano colonie tipiche e buone crescite, comparabili con il Lotto di Riferimento

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non-target Gram positivi: *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29212. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi la crescita dei ceppi non target risulta completamente inibita alla diluizione 10⁻¹.

13 - LIMITI DEL METODO

- Sul terreno crescono anche batteri Gram negativi aerobi o anaerobi facoltativi diversi dalle *Enterobacteriaceae* (es. *Pseudomonas*, *Aeromonas*).
- Il terreno non differenzia batteri lattosio non fermentanti quali *Proteus* spp. da *Salmonella* e *Shigella*. Si consiglia di testare le colonie con una goccia di reagente MUCAP (REF 191500), osservando dopo 3-5 minuti per lo sviluppo di fluorescenza sotto la lampada di Wood, prodotta in presenza dell'enzima C₈ esterasi, tipico di *Salmonella* spp.¹⁰
- Desoxycholate Agar non contiene un sistema indicatore per la produzione di idrogeno solforato quindi le colonie di *Salmonella* sono prive di centro nero.
- A pH superiori a 7,5 il terreno perde parte del suo potere inibitorio verso il batteri Gram positivi^{1,4}.
- Con il surriscaldamento del terreno vi può essere una diminuzione del potere gelificante dell'agar dovuto alla sua idrolisi da parte del ferro citrato e del sodio citrato^{1,4}.
- È consigliabile l'impiego del terreno preparato fresco in giornata.⁴
- 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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 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 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 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 +10°C /+30°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 produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Leifson E. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. J Pathol Bacteriol 1935; 40: 581-599.
2. Atlas D, Snyder J. Media Reagents and Stains. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015, p.335.
3. American Public Health Association (1978) Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th ed. 1978; New York: APHA Inc, pp. 58-59.
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 4	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	03/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

