

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

Terreno di coltura in polvere

*Salmonella* Typhimurium su
Desoxycholate Citrate Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione degli enterobatteri patogeni (*Salmonella* e *Shigella*) del tratto intestinale, da campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptone	5,00 g
Estratto di carne	5,00 g
Lattosio	10,00 g
Sodio citrato	5,00 g
Ferro ammonio citrato	1,00 g
Sodio desossicolato	2,50 g
Sodio tiosolfato	5,00 g
Rosso neutro	0,03 g
Agar	15,00 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Desoxycholate Citrate Agar è preparato secondo una modificazione della formulazione descritta da Leifson¹ nel 1935, ed è indicato per l'isolamento e la differenziazione dei patogeni enterici Gram negativi (*Salmonella* e *Shigella*) dalle feci.

Sono state proposte diverse formulazioni ispirate ai terreni originali di Leifson¹, di Haynes² e di Hajna e Damon³ nelle quali si ritrovano concentrazioni differenti di sodio citrato, di ferro citrato o di ferro ammonio citrato e di sodio desossicolato, presenza o assenza di saccarosio e di sodio tiosolfato, concentrazioni leggermente diverse di rosso neutro. Desoxycholate Citrate Agar (Leifson) ha caratteristiche di maggiore selettività rispetto al Desoxycholate Agar (REF 401370) e risulta comunque meno selettivo del terreno di Haynes⁴.

Il peptone e l'estratto di carne forniscono azoto, carbonio ed oligoelementi per la crescita microbica; la selettività del terreno è dovuta alla presenza del sodio desossicolato, del sodio citrato e del ferro citrato che permettono una buona crescita dei patogeni enterici, una inibizione da parziale a totale dei coliformi ed una totale inibizione dei batteri Gram positivi. Il ferro citrato ed il sodio tiosolfato costituiscono il sistema indicatore della produzione di idrogeno solforato. Il lattosio è inserito nel terreno come carboidrato fermentabile, il rosso neutro come indicatore di pH: i rari coliformi la cui crescita è consentita dal sistema inibitore, 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 non acidificano il terreno di coltura e coltivano con colonie incolori con o senza centro nero, in funzione della loro capacità di produrre idrogeno solforato.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 48,5 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, rosata
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	limpido, rosso
pH (20-25°C)	7,3 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Desoxycholate Citrate Agar	Terreno di coltura in polvere	4013752	500 g (10,3 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

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

8 - CAMPIONI

Possono essere utilizzati i campioni clinici sui quali ricercare e differenziare i patogeni enterici Gram negativi (generalmente feci o tampone rettale). Seguire le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9 - 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 su Desoxycholate Citrate Agar e su un secondo terreno.⁵





Per l'isolamento di *Shigella* da campioni fecali, si consiglia l'arricchimento in GN Broth, seguito dall'isolamento su due diversi terreni selettivi: Desoxycholate Citrate Agar e un secondo terreno meno selettivo (es. Mac Conkey Agar).⁵ Incubare le piastre di Desoxycholate Citrate Agar, inoculate con il campione o con il campione arricchito in terreno liquido, in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore. Le colonie di *Salmonella* possono richiedere una incubazione di 48 ore per lo sviluppo completo del colore e del precipitato nero.

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 (tra cui *Salmonella* e *Shigella*): colonie incolori con o senza centro nero; le colonie di *Salmonella* presentano generalmente il centro nero, le colonie di *Shigella* ne sono prive. 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 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
<i>S.Typhimurium</i> ATCC 14028	35-37°C / 18-24 H / A	crescita, colonie incolori con centro nero
<i>S.flexneri</i> ATCC 12022	35-37°C / 18-24 H / A	crescita, colonie incolori
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24 H / A	crescita parzialmente inibite, colonie rosso-viola
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	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 Citrate Agar vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento. La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con 4 ceppi target: *S.Enteritidis* NCTC 5188, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.Gallinarum* di isolamento clinico, *S.flexneri* ATCC 12022, *S.sonnei* ATCC 9290, *S.boydii* ATCC 9207. Le colonie di *Salmonella* appaiono incolori con lieve centro nero, le colonie di *Shigella* si presentano incolori; sono anche valutate le cariche microbiche di questi ceppi e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi 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 di ceppi non target Gram positivi (*E.faecalis* ATCC 19433 e *S.aureus* ATCC 25923) e Gram negativi (*P.mirabilis* ATCC 10005 ed *E.coli* ATCC 25922). Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E.faecalis* e *S.aureus* risultano completamente inibiti, la crescita dei ceppi Gram negativi non target risulta parzialmente inibita con lo sviluppo di colonie con le tipiche caratteristiche cromatiche.

13 - LIMITI DEL METODO

- A pH superiori a 7,5 il terreno perde parte del suo potere inibitorio verso i batteri Gram positivi.⁴
- Con il surriscaldamento del terreno vi può essere un incremento delle proprietà selettive ed 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 Non ridisciogliere il terreno una volta che sia stato preparato poiché questa operazione ne può ridurre le caratteristiche di produttività verso i ceppi target.⁶
- Sul terreno possono crescere anche batteri Gram negativi aerobi o anaerobi facoltativi lattosio non fermentanti, diversi dalle *Enterobacteriaceae* (es. *Pseudomonas*, *Aeromonas*).
- Il terreno non differenzia batteri lattosio non fermentanti quali *Proteus* spp. da *Salmonella* e *Shigella*. La differenziazione tra *Proteus* e *Salmonella* può essere effettuata rapidamente sulla piastra, con il reattivo MUCAP Test:⁷ deporre una goccia di reagente MUCAP (REF 191500) sulle colonie ed osservare 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.
- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. È necessario pertanto utilizzare, insieme al Desoxycholate Citrate Agar, terreni aggiuntivi per l'isolamento di *Salmonella* e/o *Shigella*, con selettività inferiore, come Mac Conkey Agar e con selettività più elevata, come SS Agar e, se si sospetta la presenza di *S.Typhi*, impiegare Bismuth Sulphite Agar; è consigliabile altresì la semina del campione su altri terreni culturali specifici per altri patogeni enterici.⁵
- 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 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, provetta o flacone.
- 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 +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. Hynes M. The isolation of intestinal pathogens. *J Pathol Bacteriol* 1942; 54:193-207.
3. Hajna AA, Damon SR, New enrichment and plating medium for the isolation of Salmonella and Shigella organisms. *App Microbiol*. 1956; 4:341.
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. Escherichia, Shigella and Salmonella. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.685.
6. Liang C, Fung DY. Performance of Some Heat-Sensitive Differential Agars Prepared and Melted by Microwave Energy. *J Food Prot*. 1988 Jul; 51(7):577-578.
7. Ruiz J, Sempere MA, Varela C, Gomez J. Modification of the methodology of stool culture for Salmonella detection, *J Clin Microbiol* 1992; 30:525-526.

401375 DESOXYCHOLATE CITRATE AGAR

SDS

Regolamento (UE) 2020/878

Contiene: SODIO DESOSSICOLATO
FERRO III AMMONIO CITRATO ROSSO

Classificazione: nessuna**Etichettatura:** nessuna**Indicazioni di pericolo:** EUH 210 Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta.**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

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 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 6	Modifiche a: "caratteristiche delle prestazioni", "limiti del metodo", "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	03/2022
Revisione 7	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023
Revisione 8	Inserimento della sezione relativa alla SDS	05/2025

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

