



DESOXYCHOLATE LACTOSE AGAR

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno leggermente selettivo per l'isolamento e la differenziazione di batteri enterici Gram-negativi e per il conteggio dei coliformi da acqua, acque reflue, latte e prodotti caseari.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Peptocomplex	10,000 g
Lattosio	10,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Sodio citrato	2,000 g
Sodio desossicolato	0,500 g
Rosso neutro	0,033 g
Agar	15,000 g

* La formulazione può essere compensata e/o corretta per soddisfare le prestazioni alle specifiche.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Desoxycholate Lactose Agar viene preparato sulla base di una modifica della formulazione descritta da Leifson¹ nel 1935, abbassando la concentrazione di sodio desossicolato. Desoxycholate Lactose Agar è stato raccomandato da APHA^{2,3} nelle procedure pour plate per l'isolamento e il conteggio dei coliformi nel latte, nell'acqua e in altri campioni. Il terreno non è più incluso nelle recenti edizioni di questi manuali. Peptocomplex fornisce azoto, carbonio e oligoelementi per la crescita microbica; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico; la scarsa selettività è dovuta alla presenza di sodio desossicolato e sodio citrato che consentono una buona crescita dei batteri Gram-negativi e una parziale inibizione dei batteri Gram-positivi. Il lattosio è incluso nel terreno come carboidrato fermentabile, il rosso neutro come indicatore di pH: i coliformi fermentano il lattosio producendo un'acidificazione del terreno ed esibendo colonie di colore rosso, spesso circondate da un alone opaco rosa-rosso dovuto alla precipitazione del desossicolato di sodio. I batteri che non fermentano il lattosio (inclusi i patogeni enterici *Salmonella* e *Shigella*) non acidificano il terreno e crescono con colonie incolori.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 42,5 g in 1000 ml di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente e far bollire per 1 minuto per dissolvere completamente il terreno. Raffreddare a 47-50 °C, mescolare bene e versare in piastre Petri sterili. Non sterilizzare in autoclave e non surriscaldare.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in polvere	Fine granulometria omogenea, da beige-rosa
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	rosso-violetto, limpido.
pH (20-25°C)	7,1 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Desoxycholate Lactose Agar	Terreno di coltura in polvere	4013802	500 g (11,7 L)

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, anse sterili e temponi, termostato e altra strumentazione richiesta, beute, piastre di Petri sterili, reagenti e terreni accessori.

8 – CAMPIONI

Desoxycholate Lactose Agar è destinato al trattamento batteriologico di acqua, acque reflue, latte, latticini e altri campioni di rilevanza sanitaria. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Conteggio dei coliformi nell'acqua e nei latticini:⁴

- Introdurre 1-4 mL di campione (e/o diluizioni decimali del campione) in piastre Petri sterili.
- Aggiungere 10-20 mL di terreno raffreddato a 44-47°C e mescolare bene il terreno con l'inoculo.
- Lasciare solidificare il terreno e versare uno strato di copertura superficiale di 3-4 mL di terreno non inoculato.
- Incubare in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore. Se negativo dopo 24 ore, reincubare per altre 18-24 ore.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie.

I batteri Gram-negativi crescono con caratteristiche diverse a seconda della loro capacità di fermentare il lattosio e di indurre variazioni dell'indicatore di pH.

Batteri Gram-negativi fermentanti il lattosio (coliformi): colonie lenticolari rosa o rosso vivo talvolta circondate da una zona opaca rosso-rosa (precipitazione di sodio desossicolato).

Batteri enterici Gram-negativi non fermentanti il lattosio: colonie incolori

11 – CONTROLLO DI QUALITÀ

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. Nella tabella che segue 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 circondate da un alone opaco rosso-rosa
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	35-37°C / 18-24 H / A	crescita, colonie incolori
<i>S. aureus</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24 H / A	inibito

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Desoxycholate Lactose Agar disidratato viene testato per produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività è testata con metodo quantitativo per inclusione, con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 e *E. aerogenes* ATCC 13048; le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie ed incubate a 37°C per 18-24 ore. Le colonie vengono contate sul lotto da testare e sul lotto di riferimento e viene calcolato il rapporto di produttività. Se Pr è $\geq 0,7$ e se la morfologia ed il colore delle colonie sono tipiche (colonie rosa-rosse con alone rosso opaco) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità è testata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. flexneri* ATCC 12022. Dopo l'incubazione, entrambi i ceppi mostrano una buona crescita con colonie incolori.

La selettività è valutata con metodo Miles-Misra modificato in superficie inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi Gram positivi non target *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923. La crescita di ceppi non-target è totalmente inibita.

13-LIMITI DEL METODO

- I batteri Gram-negativi aerobi o anaerobi facoltativi diversi dalle *Enterobacteriaceae* (ad es. *Pseudomonas*, *Aeromonas*) possono crescere sul terreno con colonie incolori.
- Desoxycholate Lactose Agar non contiene un sistema indicatore per la produzione di idrogeno solforato, pertanto le colonie di *Salmonella* non hanno un centro nero.
- A pH superiori a 7,5 il terreno perde alcune delle sue proprietà inibitorie nei confronti dei batteri Gram-positivi.^{1,4}
- Con il surriscaldamento potrebbe verificarsi una diminuzione del potere gelificante dell'agar a causa della sua idrolisi da parte del citrato di sodio.^{1,4}
- Anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati da coltura pura per una completa identificazione. Se pertinente, eseguire test di sensibilità antimicrobica.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è 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.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere, i supplementi ed i ceppi 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.
- 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 preparazione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). Secondo MacFaddin, le piastre preparate in autonomia possono essere conservate a +2°C +8°C fino a 7 giorni.⁴




16 - BIBLIOGRAFIA

- 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.
- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 11th ed. 1960.
- American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th ed. 1967
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 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	01/2023

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

