



SELENITE CYSTINE BROTH BASE

SODIUM BISELENITE

Terreno di coltura in polvere e supplemento

1 – DESTINAZIONE D’USO

Terreno liquido di arricchimento selettivo utilizzato nelle procedure per la rilevazione di *Salmonella* spp. in campioni alimentari e di acque.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

Triptone	5,00 g
Lattosio	4,00 g
Sodio fosfato bibasico	10,00 g
L-cistina	0,01 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Selenite Cystine Broth si basa sui primi lavori di Klett¹ e Guth² che dimostrarono gli effetti inibitori selettivi del selenito e lo utilizzarono per la coltura di organismi tifoidi. Vent’anni dopo, Leifson³ utilizzò queste informazioni per studiare a fondo l’attività del selenito, per formulare il brodo liquido di selenito e per promuoverne l’ampio uso come terreno di arricchimento per l’isolamento di *Salmonella* spp.

Selenite Cystine Broth si basa su una modifica apportata nel 1953 da North e Bartram⁴ alla formula originale di Leifson, che differisce solo per l’aggiunta di L-cistina, ritenuta in grado di favorire la crescita della *Salmonella* riducendone la tossicità⁵.

Selenite Cystine Broth è raccomandato dai metodi FDA-BAM⁶ e AOAC⁷ per l’arricchimento selettivo della gomma di guar e degli alimenti sospettati di essere contaminati da *Salmonella* Typhi. È incluso come arricchimento selettivo nell’allegato D⁸⁻⁹ della norma ISO 6579-1 e nella norma ISO 19250¹⁰ per la rilevazione di *Salmonella* Typhi e Paratyphi.

Per ridurre al minimo ogni possibile rischio di teratogenicità per gli operatori di laboratorio, il selenito acido di sodio non è incluso nel terreno disidratato Selenite Cystine Broth Base, ma deve essere preparato separatamente come soluzione con la materia prima fornita REF 4123651 e aggiunto al terreno di coltura.

Il triptone fornisce carbonio, azoto e oligoelementi per la crescita batterica. Il selenito acido di sodio (sinonimi: idrogeno selenito di sodio, biselenito di sodio), a pH neutro, è inibitorio per i coliformi e alcune altre specie microbiche, come gli streptococchi fecali e altri batteri Gram-positivi, ma non per la maggior parte delle *Salmonella* spp, tra cui *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi. Si ritiene che, in parte, la tossicità del selenito per i microrganismi possa essere attribuita all’incorporazione nelle proteine degli analoghi del selenio degli aminoacidi contenenti zolfo¹¹. Il tampone fosfato riduce la tossicità del selenito e tende a minimizzare gli effetti alcalinizzanti indotti dalla riduzione del selenito di sodio; tali effetti alcalinizzanti diminuirebbero notevolmente le proprietà selettive del mezzo. Anche gli acidi prodotti dai microrganismi a partire dal lattosio contribuiscono a neutralizzare le reazioni alcaline del terreno. La L-cistina favorisce la crescita di *Salmonella* riducendo ancora una volta la tossicità del terreno di coltura.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sciogliere 4 g di Biselenite di sodio (REF 4123651) in 1 litro di acqua purificata fredda e aggiungere 19 g di Selenite Cystine Broth Base. Scalpare fino a completa dissoluzione e distribuire in provette o beute sterili. Non surriscaldare o sterilizzare in autoclave.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del biselenite di sodio	polvere bianca
Aspetto della soluzione	giallo molto chiaro, limpida
pH finale (20-25 °C)	7,0 ± 0,1

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Selenite Cystine Broth Base	Terreno in polvere	402026B2	500 g (21,7 L)
		402026B4	5 kg (217L)
Sodium Biselenite	Materia prima	4123651	100 g (25 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio come richiesto, beute, provette sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Campioni di alimenti, mangimi, catena alimentare e acque. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.⁵⁻¹⁰

9 – PROCEDURA DELL’ANALISI

L’identificazione di *Salmonella* negli alimenti richiede quattro fasi successive: pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo, arricchimento in due terreni liquidi selettivi, semina su piastra e riconoscimento, conferma.

Pre-arricchimento

Gli organismi di *Salmonella* negli alimenti e nelle acque sono spesso presenti in numero ridotto e possono essere danneggiati in modo sub-litale. Attraverso il pre-arricchimento, le cellule di *Salmonella* crescono fino a raggiungere un livello rilevabile. I metodi statunitensi⁵⁻⁷ suggeriscono diversi terreni di pre-arricchimento a seconda del campione da analizzare, mentre le norme ISO⁸⁻¹⁰ raccomandano un unico terreno (Buffered Peptone Water).

Arricchimento selettivo

Metodo FDA-BAM⁶ per la gomma di guar e gli alimenti sospettati di essere contaminati da serovar Typhi:

- Trasferire 1 mL di brodo di pre-arricchimento in 10 mL di Selenite Cystine Broth e un altro 1 mL in 10 mL di Tetrathionate Broth.
- Incubare 24 ± 2 ore a 35°C.





Metodo ISO 6579-1 per il rilevamento di *Salmonella* Typhi e Paratyphi^{8,9}.

10 mL di Selenite Cystine Broth vengono inoculati con 1 mL della coltura di pre-arricchimento (oltre all'inoculo di RVS broth o MSRV agar e MKTTn broth) e incubati tra 34 °C e 38 °C per 24 h e 48 h.

Semina su piastra

Metodi USA^{6,7}: agitare le provette di coltura di arricchimento e strisciare 10 µL su Bismuth Sulphite Agar, Hektoen Enteric Agar e XLD Agar e incubare a 35°C per 22-26 ore.

ISO 6578 (Allegato D)^{8,9}: inoculare con un'ansa da 10 µL la superficie di una piastra XLD in modo da ottenere colonie ben isolate. Procedere allo stesso modo con Bismuth Sulphite Agar.

Incubare le piastre di entrambi i terreni tra 34 °C e 38 °C ed esaminarle dopo 24 ore e, se necessario, dopo 48 ore.

Conferma

Eseguire i test di conferma delle colonie ottenute sui terreni di coltura secondo il metodo di analisi in uso.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la crescita degli organismi in Selenite Cystine Broth è indicata dalla torbidità e spesso da un cambiamento di colore del terreno di coltura verso il rosa-arancio-rosso.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può eseguire il proprio controllo di qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.⁹

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T / ATM	RISULTATI ATTESI
S. Typhimurium ATCC 14028 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 + <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	34-38 °C / 24 h ± 3 h / A	>10 colonie caratteristiche su XLD agar o altro terreno a scelta
<i>E. coli</i> ATCC 25922	34-38 °C / 24 h ± 3 h / A	Inibizione parziale, ≤100 colonie su TSA
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	34-38 °C / 24 h ± 3 h / A	Inibizione parziale, <10 colonie su TSA

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Selenite Cystine Broth Base disidratato e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi target in provette, incubando a 37°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento (Gr_{RB}) e nel lotto di prova (Gr_{TB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: S. Typhimurium ATCC 14028 e S. Enteritidis ATCC 13076. L'indice di produttività Gr_{RB}-Gr_{TB} per ogni ceppo di prova deve essere ≤ 1.

La produttività e la selettività sono testate anche con miscele di diluizioni appropriate di ceppi target e non target: S. Typhimurium ATCC 14028 + *E. coli* ATCC 25922 + *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione delle provette inoculate a 37°C per 24 ore e la subcoltura su Brilliant Green Agar modificato, i ceppi target mostrano una crescita predominante sui terreni di coltura con più di 10 colonie caratteristiche.

Inoltre, la selettività viene valutata inoculando circa 10.000 UFC/provetta di organismi non target con il metodo delle diluizioni ad estinzione, incubando a 37°C per 24 ore e subcoltivando su piastre di Tryptic Soy Agar. La selettività è testata con i seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 25922 e *E. faecalis* ATCC 29212. Le UFC di *E. coli* devono essere ≤100 sulle piastre subcoltivate di Tryptic Soy Agar; le UFC di *E. faecalis* devono essere inferiori a 10 sulle piastre subcoltivate di Tryptic Soy Agar.

13 – LIMITE DEL METODO

- Dopo un lungo periodo di conservazione del terreno di coltura disidratato, il colore del brodo preparato potrebbe cambiare in rosso/rossastro. Le prestazioni microbiologiche, tuttavia, non vengono compromesse. Scartare le provette se la selenite si ossida e forma grandi quantità di precipitato rosso.¹²
- Il brodo di selenite è tossico per *Salmonella* Cholerae-suis e per *Salmonella* Abortus-ovis.¹³
- Le colonie di *Salmonella* presunta devono essere sottoposte a subcoltura e la loro identità deve essere confermata mediante test biochimici e sierologici appropriati.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Questo terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico e all'uso professionale; deve essere utilizzato da personale di laboratorio adeguatamente addestrato e qualificato, osservando le precauzioni approvate per il rischio biologico e le tecniche aseetiche.
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Biselenite di sodio è classificata come pericolosa dalla legislazione vigente. Prima dell'uso, consultare la scheda di sicurezza.
- Questo terreno di coltura contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* sugli animali e quelli durante il ciclo produttivo e distributivo delle materie prime, non possono garantire completamente che questo prodotto non contenga alcun patogeno trasmissibile. Pertanto, si raccomanda di trattare il terreno di coltura come potenzialmente infettivo e di manipolarlo osservando le consuete precauzioni specifiche: non ingerire, inalare o far entrare in contatto con pelle, occhi e mucose. Scarica dal sito www.biolifeitaliana.it la Dichiarazione TSE, che descrive le misure messe in atto da Biolife Italiana per la riduzione del rischio legato alle malattie infettive degli animali.
- Applicare le Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di produzione dei terreni preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminanti come polvere di terreno o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima dello smaltimento. Smaltire il terreno di coltura non utilizzato e quello sterilizzato inoculato con campioni o ceppi microbici in conformità alla legislazione locale vigente.
- Non utilizzare il terreno di coltura come ingrediente attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale di produzione destinato al consumo umano e animale.
- I certificati di analisi e la scheda di sicurezza dei prodotti sono disponibili sul sito web www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni fornite in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida per l'uso corretto del prodotto, ma senza alcun obbligo o responsabilità. In ogni caso, per l'esame di campioni raccolti da distretti biologici umani e animali, per i campioni ambientali e per i prodotti destinati al consumo umano o animale, devono essere rispettate le leggi.





le normative e le procedure standard locali vigenti. Le nostre informazioni non sollevano i nostri clienti dalla responsabilità di verificare l'idoneità del nostro prodotto per lo scopo previsto.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Al ricevimento, conservare a +12°C /+8°C al riparo dalla luce diretta in un luogo asciutto. Se conservato correttamente, può essere utilizzato fino alla data di scadenza. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in luoghi umidi. Dopo l'uso, il contenitore deve essere ben chiuso. Scartare il prodotto se il contenitore e/o il tappo sono danneggiati, o se il contenitore non è ben chiuso, o in caso di evidente deterioramento della polvere (cambiamenti di colore, indurimento, grossi grumi).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (provette/bottiglie) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio). Secondo la norma ISO 6579, le provette autopreparate possono essere conservate a +2°C +8°C al buio fino alla formazione di un precipitato rosso.⁸

16 - REFERENCES

1. Klett A. Zeitsch für Hyg und Infekt 1900; 33:137-160.
2. Guth F. Zbl Bakt I Orig 1916; 77:487-496.
3. Leifson E. New selenite selective enrichment medium for isolation of typhoid and paratyphoid (salmonella) bacilli. A. J Hyg 1936; 24:423
4. North WR, Bartram MT. The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of Salmonella. App Microbiol 1953; 1:130-134.
5. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed. 2015. APHA, Washington, DC.
6. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev March 2022.
7. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 19th ed. 2012. AOAC, Arlington, VA
8. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp.
9. ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC.
10. ISO 19250:2010 Water quality — Detection of Salmonella spp.
11. Weiss KF, Ayres JC, Kraft AA. Inhibitory action of selenite on Escherichia coli, Proteus vulgaris, and Salmonella Thompson. J Bacteriol 1995; 90:857
12. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
13. Smith HW. The evaluation of culture media for the isolation of salmonellae from faeces. J. Hyg 1952; 50:21-36.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF	LOT	Fabbricante	Utilizzare entro	Proteggere dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura
Numero di catalogo	Numero di lotto				
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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

