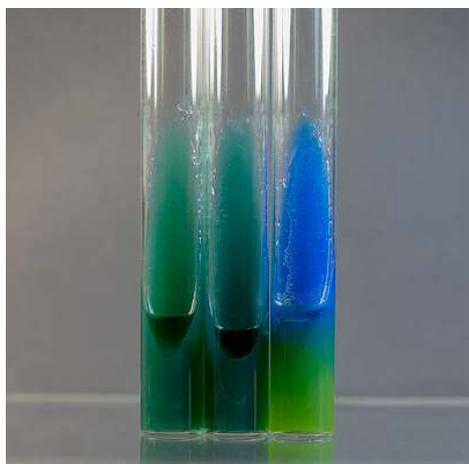


ISTRUZIONI PER L'USO

SIMMONS CITRATE AGAR

Terreno di coltura in polvere


 Simmos Citrate Agar – Da sinistra: provetta non inocolata, *E.coli*, *E. aerogenes*
1 - DESTINAZIONE D'USO

 Dispositivo diagnostico in vitro. Terreno per la differenziazione delle *Enterobacteriaceae* sulla base del test dell'utilizzo del citrato.

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

Ammonio diidrogeno fosfato	0,20 g
Sodio ammonio fosfato	0,80 g
Sodio cloruro	5,00 g
Sodio citrato tribasico	2,00 g
Magnesio solfato	0,20 g
Blu di bromo timolo	0,08 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

 Simmons Citrate Agar è una modificazione sviluppata da Simmons¹ del terreno liquido di Koser², con l'aggiunta di agar all'1,5% e di un indicatore di pH, il blu di bromotimolo.³

 Simmons Citrate Agar è un terreno nel quale l'unica fonte di carbonio è costituita dal sodio citrato e quella di azoto dall'ammonio fosfato: solo i batteri capaci di utilizzare il citrato come unica fonte di carbonio crescono su di esso. Il metabolismo del citrato, nei microrganismi che lo utilizzano come unica fonte di energia, passa attraverso la sua degradazione ad acido piruvico per mezzo di una sistema enzimatico accentrato sulla citrasi che richiede per la sua attivazione la presenza di cationi bivalenti, forniti nel terreno dal magnesio fosfato. Il risultato del metabolismo del citrato è la formazione, in ambiente acido, di acetato, lattato, acetoina, carbonati e bicarbonati. La degradazione dei sali di ammonio inorganici si traduce nella formazione di ioni ammonio: i batteri che utilizzano il citrato come unica fonte di carbonio, utilizzano l'ammonio inorganico come unica fonte di azoto e crescono con alcalinizzazione del terreno e conseguente viraggio da verde a blu dell'indicatore. Il terreno è particolarmente utile per differenziare *E.coli* (citrato neg.) da *E.aerogenes* (citrato pos.) e per differenziare *Salmonella* Enteritidis ed i membri dei sottogeneri II, III e IV di *Salmonella* (citrato pos.) da *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum (citrato neg.). Il test dell'utilizzo del citrato in piastra è indicato dalla norma ISO 10273 per differenziare *Y.enterocolitica* (test negativo) da molte altre specie del genere *Yersinia* quali *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. rohdei*, *Y. aldovae* che sviluppano reazioni positive o variabili al test.⁴
4 - PREPARAZIONE

Sospendere 23,2 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in provette ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Fare solidificare a becco di clarino con un lungo becco ed un corto fondo. La vetreria deve essere pulita chimicamente e non contenere tracce di alcali. Il terreno può essere utilizzato anche in piastra.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallo scuro
Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta	verde, limpido.
pH (20-25°C)	7,0 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Simmons Citrate Agar	Terreno di coltura in polvere	4020452	500 g (21,7 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

Il campione è costituito da colture pure di batteri isolati da campioni clinici o altri materiali

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Partendo da una coltura pura, inoculare il terreno in provetta con uno striscio leggero del becco di clarino e per infissione del fondo, avendo cura di asportare superficialmente la colonia in esame, senza trascinare tracce di terreno. Lasciare i tappi delle provette allentati. Incubare in aerobiosi a 35-37°C ed osservare il viraggio del colore del terreno dopo 24-48 ore. Alcuni batteri citrato positivi richiedono più di 48 ore per lo sviluppo della reazione: in caso di risultato negativo prolungare l'incubazione fino a 4 giorni.





10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la presenza di crescita ed il viraggio del colore del terreno, confrontando il colore delle provette inoculate con il colore di una provetta non inocolata. Il test positivo (utilizzo del citrato come unica fonte di carbonio) è indicato dalla presenza di crescita e da un intenso sviluppo di colore blu.

Il test negativo è indicato dall'assenza di crescita o da una lieve crescita senza viraggio del terreno che rimane verde.

11 - CONTROLLO 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. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

Controllo citrato positivo: *E.aerogenes* ATCC 13048

Controllo citrato negativo: *E.coli* ATCC 25922

Incubazione a 37°C per 24 h in aerobiosi

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di agar citrato Simmons disidratato viene testato per caratteristiche prestazionali specifiche (test del citrato) confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. Il terreno in provetta è inocolato con colture pure di *E.coli* ATCC 25922, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *P.stuartii* ATCC 33672, *S.flexneri* ATCC 12022, *S.Typhimurium* ATCC 14028 ceppo clinico S.Gallinarum, *Y.enterocolitica* ATCC 23715, *P.aeruginosa* ATCC 14207. Le provette vengono incubate con tappi allentati a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi. Viene osservata e registrata per ciascun ceppo la presenza di crescita ed il viraggio del colore del terreno. Test del citrato positivo, con crescita e colore blu: *E.aerogenes*, *K.pneumoniae*, *P.stuartii*, *S.Typhimurium*, *P.aeruginosa*; test del citrato negativo, nessuna crescita e nessun cambiamento di colore: *E. coli*, *S.flexneri*, *S. Gallinarum*, *Y.enterocolitica*.

13 - LIMITI DEL METODO

- Un inoculo troppo pesante può tradursi in risultati falsamente positivi.³
- Prestare attenzione nel non rimuovere, insieme alle colonie da esaminare, anche tracce di terreno di coltura poiché questo può indurre a falsi positivi. Alcuni autori consigliano di diluire le colonie in esame in soluzione fisiologica per evitare di trascinare nutrienti sul Simmons Citrate Agar (1 colonia emulsionata in una goccia di soluzione fisiologica).³
- Alcuni microrganismi positivi al citrato richiedono un'incubazione di 48 ore o più affinché si verifichi un cambiamento di pH (fino a 4 giorni).³
- Se i risultati fossero dubbi (± es., con *Providencia*) incubare nuovamente un nuovo a temperatura ambiente (22-25°C) per 7 giorni.³
- L'identificazione completa dei microrganismi coltivati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato e, se pertinente, sottoposti 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.
- 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 inocolato 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. Simmons JS. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J Infect Dis* 1926; 39:209
2. Koser SA 1923. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol* 1923; 8:493
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. ISO 10273:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*





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 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 5	Modifiche a: "formula tipica", "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	04/2022
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

