

**ISTRUZIONI PER L'USO****SS AGAR****Terreno di coltura in polvere**

SS Agar:  
*Salmonella arizonae* colonie con centro nero

**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, soprattutto *Salmonella*, da campioni clinici.

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

Estratto di carne	5,000 g
Peptocomplex	5,000 g
Lattosio	10,000 g
Sali biliari n° 3	8,500 g
Sodio tiosolfato	8,500 g
Sodio citrato	8,500 g
Ferro citrato	1,000 g
Rosso neutro	0,025 g
Agar	13,500 g
Verde brillante	0,330 mg

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

**3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

Nella prima metà del ventesimo secolo, furono sviluppati e proposti diversi terreni di coltura per l'isolamento dei patogeni enterici dalle feci e altri materiali. SS (Salmonella Shigella) Agar è una modifica del terreno desossicolato agar descritto da Leifson<sup>1</sup> nel 1935, sperimentata con successo da Catherine Mayfield e Maud Gober<sup>2</sup> nel 1941, per l'isolamento di *Shigella dysenteriae* e *Salmonella* dalle feci. Diversi anni più tardi, questo terreno è stato scoperto essere eccessivamente selettivo, ed inibitorio per alcuni ceppi di *Shigella*.<sup>3,4</sup> Per l'isolamento di *Shigella* spp. i terreni per l'isolamento primario raccomandati sono Hektoen Enteric Agar o XLD Agar.<sup>5</sup>

SS Agar è un terreno selettivo e differenziale destinato all'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, in particolare *Salmonella* da campioni clinici.<sup>5,6</sup>

I peptoni forniscono carbonio, azoto ed oligoelementi per la crescita batterica; l'alta concentrazione di sali biliari n°3, il sodio citrato ed il verde brillante inibiscono i batteri Gram-positivi e la maggior parte dei coliformi del tratto intestinale. Poiché *Salmonella* è tollerante a queste sostanze inibenti, generalmente cresce più velocemente ed in numero superiore rispetto ai coliformi. Il lattosio è fermentato dai coliformi, o almeno dai ceppi che sono in grado di crescere in presenza dei sali biliari, con produzione di acidi. Le condizioni acide nel terreno fanno virare l'indicatore rosso neutro ad un colore rosa-rosso ed inoltre inducono la precipitazione dei sali biliari con la formazione di una zona opaca attorno alle colonie. Il ferro ammonio citrato è un indicatore della formazione di idrogeno solforato; *Salmonella* spp. produce tiosolfato reductasi che causa il rilascio di una molecola di solfuro dal sodio tiosolfato presente nel terreno. Questa molecola di solfuro si accoppia con uno ione idrogeno per formare H<sub>2</sub>S gassoso che, reagendo con il ferro ammonio citrato, forma un precipitato che da luogo a colonie nere o con un centro nero.

**4 - METODO DI PREPARAZIONE**

Sospendere 60 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione per sciogliere completamente il terreno; raffreddare a circa 47-50°C mescolare e trasferire in piastre di Petri sterili.

**5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, rosata

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

rosso arancio, limpido o leggermente opalescente

pH finale a 20-25°C

7,0 ± 0,2

**6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
SS Agar	Terreno di coltura in polvere	4020752	500 g (8,3 L)
		4020754	5 kg (83 L)

**7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

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

**8 - CAMPIONI**

SS Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tampone rettale.<sup>5,6</sup> Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni.<sup>7</sup>

**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 un'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 in SS Agar ed in un secondo terreno meno selettivo.<sup>5,7</sup>  
Incubare le piastre di SS Agar inoculate con il campione o con il campione arricchito in terreno liquido, in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore.

#### 10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie isolate. Non esaminare le aree con crescita confluyente poiché la fermentazione risulta inappropriata e dà luogo a letture non attendibili.

Colonie lisce, opache, incolori con centro nero: ceppo lattosio non fermentante, H<sub>2</sub>S positivo: probabile presenza di *Salmonella*.

Colonie lisce, opache, incolori, senza centro nero: ceppo lattosio non fermentante, H<sub>2</sub>S negativo: probabile presenza di *Salmonella* H<sub>2</sub>S negativa o di un ceppo di *Shigella* non inibito dal sistema selettivo del terreno.

Colonie rosa-rosse: fermentazione del lattosio: assenza *Salmonella*

*E. coli* cresce leggermente, con colonie rosse, con precipitato rosso attorno alle colonie; *E.aerogenes* può crescere con colonie da rosa a crema, grandi, mucoidi, opache.

Poiché alcuni ceppi di *Proteus* H<sub>2</sub>S positivi possono crescere con colonie incolori con centro nero o grigio-nero e nel caso vi sia una mescolanza di colonie di *Proteus* e di *Salmonella* H<sub>2</sub>S positive, potrebbe essere difficile scegliere le colonie da sottoporre all'identificazione biochimica e sierologica. Si consiglia di testare le colonie con una goccia di reagente MUCAP Test (REF 191500), osservando dopo 3-5 minuti per lo sviluppo di fluorescenza sotto la lampada di Wood, prodotta in presenza dell'enzima C<sub>8</sub> esterasi, tipico di *Salmonella* spp.<sup>8</sup>

#### 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.<sup>9</sup>

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S.Typhimurium</i>	ATCC 14028	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie incolori con centro nero
<i>S.flexneri</i>	ATCC 12022	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie verde chiaro
<i>E.faecalis</i>	ATCC 29212	35-37°C / 18-24h / A	inibito
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	35-37°C / 18-24h / A	parzialmente inibito, colonie rosa-rosso

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 SS 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 7 ceppi target: *S.Enteritidis* ATCC 13076, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.Gallinarum* di isolamento clinico, *S.arizonae* di isolamento clinico, *S.flexneri* ATCC 12022, *S.sonnei* ATCC.9290, *S.boydii* ATCC 9207. Le colonie di *Salmonella* appaiono di colore verde chiaro con centro nero, le colonie di *Shigella* si presentano verde chiaro; 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 diluizioni da 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E.faecalis* ATCC 29212) e diluizioni da 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> di 5 ceppi non-target Gram negativi: *P.mirabilis* ATCC 10005, *P.vulgaris* ATCC 9484, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *C.freundii* ATCC 8090. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E.faecalis* risulta completamente inibito alla diluizione 10<sup>-1</sup>, 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

- Le colonie di *Proteus* spp. possono mimare le caratteristiche colturali di *Salmonella*.<sup>6</sup> La differenziazione tra *Proteus* e *Salmonella* può essere effettuata rapidamente sulla piastra, con il reattivo MUCAP Test.<sup>5</sup>
- Alcuni ceppi di *Shigella* e *Salmonella* fermentanti il lattosio possono crescere con caratteristiche simili ai coliformi e non essere riconosciuti su SS Agar.
- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. E' necessario pertanto utilizzare, insieme ad SS Agar, almeno un terreno aggiuntivo per l'isolamento di *Salmonella*, con selettività inferiore, come Mac Conkey Agar; per l'isolamento di *Shigella* spp. è consigliabile l'uso di Hektoen Enteric Agar o XLD Agar, congiuntamente ad un terreno meno selettivo come Mac Conkey Agar; è consigliabile altresì la semina del campione su altri terreni colturali, specifici per altri patogeni enterici.<sup>5</sup>
- La presenza di cristalli nel contesto del terreno, che si possono formare durante la conservazione a 2°C / 8°C, non inficia la qualità dell'analisi.
- 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 o in 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](http://www.biolifeitaliana.it).
- Comunicare a Biolife Italiana Srl ([complaint@biolifeitaliana.it](mailto: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 preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. Leifson, E. 1935. 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. 40:581-599.
2. Mayfield, C. R., and M. Gober. 1941. Comparative efficiency of plating media for the isolation of Shigella dysenteriae. Am. J. Public Health 31:363-368.
3. King, S., and W. I. Metzger. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens: II. Comparison of Hektoen Enteric Agar with S S and E M B Agar. Appl. Microbiol. 16: 579-581.
4. Taylor, W. I. 1965. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. Am. J. Clin. Pathol. 44:471-475.
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. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
8. 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.
9. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004

### 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: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	01/2022
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

