



# BIOSECTOR

## CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR II

### HEKTOEN ENTERIC AGAR

Piastre a due settori pronte all'uso

#### 1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreni di coltura selettivi e differenziali per l'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, soprattutto *Salmonella* e *Shigella*.

#### 2 - COMPOSIZIONI - FORMULE TIPICHE

##### CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR II \*

Peptoni	10,0 g
Composti selettivi, sali organici e inorganici	12,0 g
Miscela di cromogeni	0,9 g
Agar	15,0 g
Opacizzante	10,0 g
Emulsionanti	10,0 mL
Acqua purificata	1000 mL

##### HEKTOEN ENTERIC AGAR\*

Triptosio	12,000 g
Estratto di lievito	3,000 g
Sali biliari n° 3	9,000 g
Lattosio	12,000 g
Saccarosio	12,000 g
Salicina	2,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Sodio tiosolfato	5,000 g
Ferro ammonio citrato	1,500 g
Agar	15,000 g
Blu di bromotimolo	0,065 g
Fucsina acida	0,100 g
Acqua purificata	1000 mL

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

#### 3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La piastra a 2 settori con i terreni di coltura Chromogenic Salmonella Agar II ed Hektoen Enteric Agar è indicata per la determinazione nei campioni di *Salmonella* spp. (inclusa *S. Typhi* ed i ceppi di *Salmonella lac+*) e di *Shigella* spp.

**Chromogenic Salmonella Agar II** è un'evoluzione di Chromogenic Salmonella Agar, progettato per migliorare le sue proprietà selettive. Chromogenic Salmonella Agar II è un terreno selettivo e differenziale adatto per l'isolamento di *Salmonella* spp. e per l'identificazione presuntiva delle colonie.

I peptoni forniscono carbonio, azoto, vitamine e oligoelementi per la crescita batterica. I composti selettivi incorporati nel terreno sono: cefsulodina, una cefalosporina di terza generazione che ha un'attività inibitoria molto specifica verso *P. aeruginosa* e *S. aureus*; novobiocina, linezolid e desossicolato di sodio che inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi e di alcuni batteri Gram-negativi. Il contenuto della fiala A viene utilizzato per emulsionare gli ingredienti del terreno di coltura.

La differenziazione di *Salmonella* dagli altri organismi che possono crescere sul terreno è ottenuta con:

- un substrato cromogenico per l'enzima C8 esterasi, che viene scisso da *Salmonella* spp. con il rilascio di un cromoforo insolubile rosso-magenta;
- la presenza di un derivato cromogenico glucopiranosidico sul quale agisce la  $\beta$ -glucosidasi con liberazione di un metabolita color verde-blu.

Alcune *Enterobacteriaceae*, tra cui *Klebsiella* ed *Enterobacter*, ma non *Salmonella*, sono  $\beta$ -glucosidasi positive e, se crescono, formano colonie blu-verdi o blu scuro, anche se esterasi positive. Questo le rende facilmente differenziabili da *Salmonella* che invece coltiva con colonie rosso-magenta. Il sistema selettivo/differenziale del terreno consente di determinare anche i rari ceppi di *Salmonella* fermentanti il lattosio che non vengono evidenziati sui terreni tradizionali basati sulla fermentazione del lattosio. Chromogenic Salmonella Agar II è utile anche per la rilevazione di *S. Typhi* e *S. Paratyphi*. Le piastre pronte all'uso appaiono uniformemente opache il che migliora la differenziazione visiva dei colori delle colonie.

**Hektoen Enteric Agar** è un terreno selettivo e differenziale destinato all'isolamento dei patogeni enterici Gram-negativi, in particolare *Salmonella* e *Shigella*. da Hektoen Enteric Agar è raccomandato dalla norma ISO 21567<sup>5</sup> per l'isolamento di *Shigella* e da FDA-BAM<sup>6</sup> per la determinazione di *Salmonella*, negli alimenti.

Il peptone animale e l'estratto di lievito forniscono carbonio, azoto, vitamine ed oligoelementi per la crescita batterica; l'alta concentrazione di sali biliari n°3 ed i coloranti inibiscono i batteri Gram-positivi e la maggior parte dei coliformi del tratto intestinale. Poiché i patogeni enterici *Salmonella* e *Shigella* sono tolleranti a queste sostanze inibenti, generalmente crescono più velocemente ed in numero superiore rispetto ai coliformi.<sup>7</sup> Il lattosio, il saccarosio e la salicina sono fermentati dai coliformi, o almeno dai ceppi che sono in grado di crescere in presenza dei sali biliari e da alcune specie di *Proteus*, con produzione di acidi. Le condizioni acide nel terreno fanno virare l'indicatore blu di bromotimolo dal suo colore verde a pH neutro a un colore giallo-arancio 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 dà luogo a colonie nere o con un centro nero.



**4 – CARATTERISTICHE FISICHE****CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR II**

Aspetto del terreno in piastra giallastro opaco  
pH finale a 20-25°C 7,2 ± 0,2

**HEKTOEN ENTERIC AGAR**

Aspetto del terreno in piastra limpido o leggermente opalescente di colore verde intenso  
pH finale a 20-25°C 7,6 ± 0,2

**5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Biosector Chromogenic Salmonella Agar II Hektoen Enteric Agar	Piastre a due settori pronte all'uso	495350N	2 x 10 piastre ø 90 mm a due settori; confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane; confezionamento secondario: scatola di cartone

**6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazi one di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

**7 – CAMPIONI**

Le piastre a 2 settori con Chromogenic Salmonella Agar II ed Hektoen Enteric Agar sono destinate all'esame batteriologico di campioni non clinici. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni.

**8 - PROCEDURA DELL'ANALISI**

**RICONOSCIMENTO DEI TERRENI:** Chromogenic Salmonella Agar II: terreno giallastro opaco; Hektoen Enteric Agar: terreno color verde intenso. Il massimo recupero di *Salmonella* si ottiene utilizzando un arricchimento in un terreno liquido selettivo seguito dalla semina su piastra. Per l'isolamento di *Shigella*, si consiglia l'arricchimento in GN Broth, Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie dei due terreni. Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa sui due terreni, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità dei due bordi piastra, quindi strisciare su tutta la superficie dei due terreni con un'ansa. Incubare a 35-37 °C in aerobiosi ed osservare dopo 18-24 ore.

**9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie isolate. I diversi microrganismi coltivano su Chromogenic Salmonella Agar II con le seguenti caratteristiche:

Microrganismo	Caratteristiche colturali
<i>Salmonella</i> spp.	buona crescita colonie color rosso-magenta
<i>Salmonella</i> spp. lac +	buona crescita colonie color rosso-magenta o violacee
<i>Salmonella</i> Typhi	buona crescita colonie color magenta
<i>E.coli</i>	crescita scarsa con colonie incolori
<i>Enterobacter</i> spp.	crescita con colonie verde-blu o inibita
<i>Klebsiella</i> spp.	crescita scarsa con colonie verde-blu
<i>Pseudomonas</i> spp	crescita inibita
<i>Proteus</i> spp.	crescita scarsa con colonie marrone chiaro
Batteri Gram positivi	crescita inibita

Le diverse caratteristiche cromatiche delle colonie su Hektoen Enteric Agar possono essere interpretate come segue.<sup>7</sup>

- Colonie blu-verdastre, verde chiaro o trasparenti con centro nero: nessuna fermentazione degli zuccheri, produzione di H<sub>2</sub>S: sospetta presenza di *Salmonella*.
- Colonie blu-verdastre, verde chiaro o trasparenti: nessuna fermentazione degli zuccheri, assenza di H<sub>2</sub>S: sospetta presenza di *Shigella* o di *Salmonella* H<sub>2</sub>S negativa.
- Colonie gialle-arancio con un precipitato giallo arancio: fermentazione di lattosio, saccarosio o salicina, assenza di H<sub>2</sub>S: assenza di *Salmonella* e/o *Shigella*.
- Colonie da salmone ad arancio: fermentazione della salicina, assenza di H<sub>2</sub>S: assenza di *Salmonella* e/o *Shigella*.
- Colonie gialle, da salmone ad arancio con centro nero: fermentazione di lattosio o saccarosio o salicina, presenza di H<sub>2</sub>S: probabile assenza di *Shigella* e di *Salmonella*, fatta eccezione per i rari ceppi di *Salmonella* lattosio positivi.

**10 - 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>7</sup>

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR II		
S. Typhimurium ATCC 14028	35-37°C / 18-24 h / A	buona crescita, colonie color rosso-magenta
S. Enteritidis ATCC 13076	35-37°C / 18-24 h / A	buona crescita, colonie color rosso-magenta
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	35-37°C / 18-24 h / A	crescita, colonie verdi-blu
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	35-37°C / 18-24 h / A	crescita inibita
HEKTOEN ENTERIC AGAR		





S. Typhimurium	ATCC 14028	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie verdi con centro nero
S. flexneri	ATCC 12022	35-37°C / 18-24h / A	crescita, colonie verde chiaro
E. faecalis	ATCC 29212	35-37°C / 18-24h / A	inibito
E. coli	ATCC 25922	35-37°C / 18-24h / A	parzialmente inibito, colonie da giallo a salmone

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

### 11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte all'uso a due settori e delle materie prime impiegate per la produzione dei terreni in polvere: Chromogenic Salmonella Agar II, (REF 405350N) ed Hektoen Enteric Agar, (REF 401541) vengono testati per la produttività, la specificità e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

#### CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR II

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con 2 ceppi target: S. Enteritidis ATCC 13076, S. Typhimurium ATCC 14028; le piastre CSA II vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina delle sospensioni di colonie e incubate a 35-37 °C per 18-24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr). Se Pr è  $\geq 0,7$  e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie rosso-magenta), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. Inoltre, le caratteristiche di produttività vengono testate mediante tecnica ecometrica semi-quantitativa con il ceppo target S. *diarizonae* ATCC 19934 (ceppo lattosio positivo). Dopo l'incubazione, il colore delle colonie (colonie viola chiaro) e l'entità della crescita vengono valutati e registrati.

La specificità è testata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con il ceppo non target *K.pneumoniae* ATCC 700603 che, dopo incubazione a 35-37 °C per 18-24 ore, sviluppa colonie verde-blu.

La selettività è valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con diluizioni decimali in soluzione salina da  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi non target *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 13315, *A. calcoaceticus* ATCC 19606, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. hydrophila* ATCC 7966, isolato ambientale di *Mucor* sp. La crescita dei ceppi non target *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. calcoaceticus*, *A. hydrophila* e *Mucor* è inibita alla diluizione  $10^{-1}$ , mentre la crescita di *E. coli* e *P. vulgaris* è parzialmente inibita.

Secondo le specifiche, le colonie dei ceppi non target presentano il tipico colore blu-verde o sono incolore

#### HEKTOEN ENTERIC AGAR

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con 6 ceppi target: S. Enteritidis NCTC 5188, S. Typhimurium ATCC 14028, S. Gallinarum di isolamento clinico, S. *arizonae* di isolamento clinico, S. *flexneri* ATCC 12022, S. *sonnei* ATCC 9290. Le colonie di *Salmonella* appaiono di colore verde 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 modificate diluizioni di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E. faecalis* ATCC 29212) e di 6 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, *E. aerogenes* ATCC 13048. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E. faecalis* risulta completamente inibito, la crescita dei ceppi Gram negativi non target risulta parzialmente inibita con lo sviluppo di colonie con le tipiche caratteristiche cromatiche.

### 12 - LIMITI DEL METODO

- Su Chromogenic Salmonella Agar II possono coltivare, con colonie rosso-rosa, ceppi di *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ed *Aeromonas* resistenti agli agenti antimicrobici del terreno, differenziabili da *Salmonella* con il test dell'ossidasi.
- Il tasso di crescita sulle piastre di Chromogenic Salmonella Agar II dipende anche dalle richieste nutrizionali delle salmonelle. È possibile che certi ceppi con particolari caratteristiche metaboliche non crescano sul terreno o crescono privi di colore (es. *Salmonella enterica* serovar Dublin cresce con colonie bianche).
- Le colonie di *Proteus* spp. non fermentanti il saccarosio o la salicina su Hektoen Enteric Agar possono mimare le caratteristiche cromatiche di *Salmonella* o *Shigella*. Essi possono essere differenziati osservando le caratteristiche cromatiche su Chromogenic Salmonella Agar II.
- Alcuni ceppi di *Shigella* e *Salmonella* fermentanti il lattosio possono crescere con caratteristiche simili ai coliformi e non essere riconosciuti su Hektoen Enteric Agar. Tali ceppi sviluppano colonie caratteristiche su Chromogenic Salmonella Agar II.
- Non incubare per più di 24 ore poiché può verificarsi una perdita del colore giallo/salmone delle colonie su Hektoen Enteric Agar, a causa dell'utilizzo dei peptoni con produzione di alcalinità.<sup>7</sup>
- La presenza di cristalli nel contesto del terreno Hektoen Enteric Agar, 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, morfologiche ed emolitiche, 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.

### 13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il prodotto qui descritto è destinato esclusivamente al controllo microbiologico e all'uso professionale; deve essere utilizzato da personale di laboratorio adeguatamente formato e qualificato, osservando le precauzioni approvate per i rischi biologici e utilizzando tecniche asettiche.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- I terreni di coltura qui descritti contengono materie prime di origine animale. Si consiglia quindi di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso 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](http://www.biolifeitaliana.it) il documento TSE Statement, con le misure messe in atto per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smettere le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).












#### 14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C/ +8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a +2°C/ +8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

#### 15 - BIBLIOGRAFIA

1. Istituto Superiore di Sanità Le infezioni da Salmonella: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. Caterina Graziani, Pasquale Galetta, Luca Busani, Anna Maria Dionisi, Emma Filetici, Antonia Ricci, Alfredo Caprioli, Ida Luzzi 2005, 49 p. Rapporti ISTISAN 05/27
2. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella.
3. ISO19250:2010 Water quality — Determination of Salmonella species
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. ISO 21567 :2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Shigella spp.
6. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 12/2019.
7. Jan Hudzicki. Hektoen Enteric Agar Protocol. American Society for Microbiology. 11 November 2010.

#### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

#### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 0	Prima stesura	12/2025

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

