



DOUBLE MODIFIED LYSINE IRON AGAR (DMLIA) DMLIA NOVOBIOCIN SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere, supplemento selettivo e terreno pronto all'uso in piastre



Salmonella Derby on DMLIA

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento selettivo e differenziale di *Salmonella* dagli alimenti.

2 - COMPOSIZIONE*

**DOUBLE MODIFIED LYSINE IRON AGAR (DMLIA) – DEHYDRATED MEDIUM
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)***

Peptone	5,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Glucosio	1,00 g
L-Lisina HCl	10,00 g
Ferro ammonio citrato	0,80 g
Sodio tiosolfato	6,80 g
Sali biliari n° 3	1,50 g
Lattosio	10,00 g
Saccarosio	10,00 g
Porpora di Bromocresolo	0,02 g
Agar	15,00 g

DMLIA NOVOBIOCIN SUPPLEMENT

CONTENUTO DEL FLACONE PER 500 ML DI TERRENO

Novobiocina	7,5 mg
-------------	--------

DOUBLE MODIFIED LYSINE IRON AGAR DMLIA – PIASTRE PRONTE ALL'USO

Double Modified Lysine Iron Agar	63,12 g
Novobiocina	15,00 mg
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

Il terreno Double Modified Lysine Iron Agar (DMLIA), preparato aggiungendo 15 mg/L di novobiocina al terreno di base, corrisponde alla formula del terreno selettivo e differenziale descritto da Rappold e Bolderdijk¹ nel 1979 e raccomandato dall'USDA²⁻⁴ per l'isolamento di ceppi di *Salmonella* H₂S-positivi e negativi in un'ampia varietà di alimenti.

Il terreno disidratato è costituito principalmente da Lysine Iron Agar integrato con sali biliari, lattosio, saccarosio e quantità aggiuntive di tiosolfato di sodio e citrato ferrico di ammonio.

Il peptone fornisce azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; l'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B; il glucosio, il lattosio e il saccarosio sono carboidrati fermentabili; porpora di bromocresolo è un indicatore di pH, di colore giallo a pH inferiore a 5,2 e viola a pH superiore a 6,8; citrato di ammonio ferrico e tiosolfato di sodio sono il sistema indicatore per la formazione e il rilevamento dell'idrogeno solforato. La lisina è inclusa come substrato per la rilevazione della lisina decarbossilasi: quando la lisina viene decarbossilata viene convertita in cadaverina provocando una reazione alcalina (il terreno rimane viola). I sali biliari e la novobiocina (inclusa nel supplemento selettivo) sono gli agenti inibitori, attivi soprattutto contro i batteri Gram-positivi ma anche contro alcuni Gram-negativi.

Salmonella spp. decarbossila la lisina e, essendo positiva al lattosio/saccarosio, induce una reazione alcalina nel terreno di coltura con lo sviluppo di colonie con diverse tonalità di viola (colonie malva); la formazione di idrogeno solforato è indicata dalla formazione di colonie con centro nero.

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 31,56 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino a ebollizione, agitare frequentemente per sciogliere completamente. Non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a circa 45-50°C e aggiungere il contenuto di una fiala di DMLIA Novobiocin Supplement (REF 4240029) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e distribuire 15-20 mL in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, verde
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	viola, leggermente opalescente
Aspetto del supplemento liofilizzato	pastiglia bassa, compatta, bianca, soluzione limpida e incolore dopo ricostituzione
pH (20-25°C)	6,7 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Double Modified Lysine Iron Agar (DMLIA)	Terreno di coltura in polvere	4013252	500 g (7,9 L)
DMLIA Novobiocin Supplement	Supplemento liofilizzato	4240029	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Double Modified Lysine Iron Agar (DMLIA)	Piastre pronte all'uso	541325	2 x 10 piastre, ø 90 mm



7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, aghi da inoculazione sterili, tamponi e pipette, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, piastre Petri sterili, beute, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Carne, pollame, uova pastorizzate e prodotti siluriformi (pesce) e spugne ambientali. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento alla norma internazionale applicabile.²

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Trasferire 50µL della crescita ottenuta dai brodi di arricchimento selettivo strisciando con un ansa sterile sui quattro quadranti di una piastra di Double Modified Lysine Iron Agar (DMLIA) per ottenere colonie isolate.

Incubare a 35 ± 2 °C per 18-24 ore. In assenza di crescita o di colonie tipiche, incubare nuovamente per altre 18-24 ore.

Per i dettagli analitici si rimanda al documento USDA citato.²

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie. Considerare le colonie color malva con o senza centro nero come colonie tipiche di *Salmonella*.

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 ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.⁵

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Salmonella</i> spp. H ₂ S positiva	35°C / 24h / A	buona crescita, colonie color malva con centro nero
<i>Salmonella</i> spp. H ₂ S negativa	35°C / 24h / A	buona crescita, colonie color malva senza centro nero

A: incubazione aerobica

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima della commercializzazione, i campioni rappresentativi di tutti i lotti di Double Modified Lysine Iron Agar (DMLIA) e DMLIA Novobiocin Supplement disidratati e pronti all'uso vengono testati per produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Le caratteristiche di produttività sono valutate mediante tecnica ecometrica semi-quantitativa con i seguenti ceppi non target: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. arizonae* ATCC 13314, *S. Derby* CBAES1.5, *S. Gallinarum* CB506, *S. Dublin* CB9.2, *S. Choleraesuis* CBX4. Dopo l'incubazione, vengono valutate la quantità di crescita e le caratteristiche della colonia: tutti i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie color malva, con centro nero.

La specificità è testata con il ceppo non target *S. sonnei* ATCC 9290 mediante tecnica ecometrica semiquantitativa. Dopo l'incubazione, *S. sonnei* cresce con colonie incolori.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione McFarland 0,5 di *E. coli* ATCC 8739, *C. freundii* ATCC 8090 ed *E. faecalis* ATCC 19433. *C. freundii* presenta colonie gialle, la crescita di *E. coli* è parzialmente inibita mentre la crescita di *E. faecalis* è totalmente inibita.

CB: Collezione microbica Biolife

13 – LIMITI DEL METODO

- Le varianti di *Salmonella* lattosio-positivo sono state descritte con un tasso di incidenza inferiore all'1%.^{5,6} Queste salmonelle possono crescere con colonie giallastre sulla piastra DMLIA.
- L'identificazione completa delle colonie deve essere effettuata mediante tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, previa purificazione delle colonie mediante subcoltura su terreno appropriato. Per i dettagli analitici si rimanda al documento citato USDA.²

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in polvere, il supplemento e le piastre pronte sono da intendersi solo per controlli microbiologici e per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di base e i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. DMLIA Novobiocin Supplement è classificato come pericoloso dalla normativa vigente. Prima dell'uso consultare le schede 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.
- Prestare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- Ciascuna piastra di questo terreno di coltura è esclusivamente monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- 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 e il supplemento non utilizzato ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.



- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi 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

Piastre pronte all'uso

Conservare nella confezione originale a +2 /+8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

Terreno disidratato

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).

Supplemento liofilizzato

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni 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). Secondo il documento USDA, le piastre preparate autonomamente possono essere conservate a +2°C +8°C per un massimo di 3 settimane.³

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Rappold H, Bolderdijk R. Modified lysine iron agar for isolation of Salmonella from food. *Appl Environ Microbiol* 1979; 38(1):162-3.
2. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. Laboratory Guidebook, Notice of Change: Isolation and Identification of Salmonella from Meat, Poultry, Pasteurized Eggs and Siluriformes (Fish) Products and Environmental Sponges. MLG 1.11, Effective Date: 08/16/21.
3. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. Laboratory Guidebook, Notice of Change: Media and Reagents. MLG Appendix 1.10, Effective Date: 03/07/22.
4. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science Laboratory Guidebook, Notice of Change: Flow Chart Specific for FSIS Laboratory Isolation and Identification of Salmonella. Chapter MLG 4.0, , Effective Date 02/24/20.
5. Ewing W H. Edwards and Ewing's identification of the Enterobacteriaceae. 4th ed. New York, N.Y: Elsevier Science Publishing Co., Inc.; 1986. Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions; pp. 47–72.
6. Patrick L. McDonough, Sang J. Shin, Donald H. Lein. Diagnostic and Public Health Dilemma of Lactose-Fermenting Salmonella enterica Serotype Typhimurium in Cattle in the Northeastern United States. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): 1221–1226.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 1	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

