

**ChromArt****CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR BASE II  
SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT II  
CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR II****Terreno di coltura in polvere, supplemento selettivo e piastre pronte all'uso****1 - DESTINAZIONE D'USO**Terreno selettivo e cromogeno per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *Salmonella*.**2 - COMPOSIZIONE****CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR BASE II  
TERRENO DISIDRATATO****FORMULA TIPICA DOPO RICOSTITUZIONE CON UN LITRO DI ACQUA\***

Peptoni	10,0 g
Composti selettivi, sali organici e inorganici	12,0 g
Miscela di cromogeni	0,9 g
Agar	15,0 g

**SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENTS II****SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT II VIAL A****Contenuto della fiala per 500 mL di terreno**

Emulsionanti	5,0 mL
--------------	--------

**SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT II VIAL B****Contenuto della fiala per 500 mL di terreno**

Miscela di antibiotici (cefsulodina, novobiocina, linezolid) 8,5 mg

**CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR II****PIASTRE PRONTE ALL'USO- FORMULA TIPICA**

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
Miscela di antibiotici (cefsulodina, novobiocina, linezolid)	17,0 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**

*Salmonella* rimane una delle cause più importanti di gastroenterite di origine alimentare e da almeno 30 anni sono disponibili test e terreni di coltura fluorogeni e cromogeni, sviluppati per la rilevazione di *Salmonella* spp. Nel 1987 Biolife Italiana ha sviluppato e introdotto un test fluorogenico rapido di screening, il MUCAP Test, per l'identificazione delle colonie di *Salmonella*, basato sulla determinazione di uno specifico enzima prodotto da *Salmonella*, la C8 esterasi, utilizzando un substrato coniugato con il fluoroforo 4-metilumbelliferone.<sup>1</sup> Alcuni anni dopo, lo stesso principio di rilevazione della C8 esterasi è stato sfruttato per lo sviluppo di un terreno di coltura cromogeno, il Chromogenic Salmonella Agar, che ha dimostrato una elevata specificità e sensibilità nella determinazione di *Salmonella* spp.<sup>2,3</sup> Chromogenic Salmonella Agar II è un'evoluzione di Chromogenic Salmonella Agar, progettato per migliorare le sue proprietà selettive e differenziali e la trasparenza del terreno di coltura.

Chromogenic Salmonella Agar II è un terreno selettivo e differenziale con fondo trasparente, adatto per l'isolamento di *Salmonella* spp. e per l'identificazione presuntiva delle colonie. I terreni cromogeni sono inclusi come secondo terreno di coltura negli standard ISO per la rilevazione di *Salmonella* in alimenti e acque.<sup>5,6</sup>

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 cromogeno 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*. Poiché l'agente opacizzante è assente nella composizione del terreno disidratato, le piastre preparate in laboratorio presentano uno sfondo trasparente. Le piastre pronte all'uso invece contengono silice; pertanto, il terreno appare uniformemente opaco, il che migliora la differenziazione visiva dei colori delle colonie.

**4 - METODO DI PREPARAZIONE**

Sospendere 19 g di terreno in 500 mL di acqua purificata fredda; aggiungere il contenuto di un flacone di Salmonella Selective Supplement, Vial A (REF 4240013N). Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47°C-50°C ed aggiungere il contenuto di una fiala di Salmonella Selective Supplement, Vial B (REF 4240013N), ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile. Mescolare con cura e distribuire in piastre di Petri. Per preparare piastre con sfondo opaco, aggiungere 10-15 g/L di silice al terreno di base prima della sterilizzazione in autoclave.



**5 - CARATTERISTICHE FISICHE****CHROMOGENIC SALMONELLA AGAR BASE II**

Aspetto della polvere fine granulometria omogenea, beige  
 Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra giallastra opalescente  
 pH finale a 25 °C 7,2 ± 0,2

**SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT II VIAL A**

Aspetto della soluzione giallastra, leggermente opalescente

**SALMONELLA SELECTIVE SUPPLEMENT II VIAL B**

Aspetto del liofilizzato pastiglia bassa, compatta, bianca  
 Aspetto della soluzione biancastra, incolore

**6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Salmonella Agar Base II	Terreno in polvere	405350N2	500 g (13,2 L)
Chromogenic Salmonella Agar Base II	Terreno in polvere	405350N4	5 kg (132 L)
Salmonella Selective Supplement II	Supplemento selettivo	4240013N	5 vial A + 5 vial B, ciascuna per 500 mL di terreno
Chromogenic Salmonella Agar II	Piastre pronte all'uso	545350N	20 piastre

**7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI**

Autoclave, 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**

Chromogenic Salmonella Agar Base II è destinato all'analisi batteriologica di campioni alimentari e ambientali. È necessario applicare le buone pratiche di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni.<sup>7</sup> Consultare i metodi standard appropriati per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni.<sup>5,6</sup>

**9 - PROCEDURA DELL'ANALISI**

La ricerca di *Salmonella* in alimenti e altri campioni di interesse sanitario richiede quattro fasi successive: pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo, arricchimento in uno o due terreni liquidi selettivi, semina e riconoscimento, conferma.<sup>5,6</sup>

Lasciare che le piastre raggiungano la temperatura ambiente e asciugare la superficie del terreno.

Dal Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth (REF 401981) o dal terreno MSRV Medium (REF 401982) incubati a 41,5 °C ± 1 per 24 h ± 3 h e dal MKTT Broth (REF 401745) incubato tra 34 °C e 38 °C per 24 h ± 3 h, trasferire un'ansa di crescita su una piastra di Chromogenic Salmonella Agar II e su un altro terreno selettivo per *Salmonella*.

Incubare le piastre capovolte tra 34 °C e 38 °C ed esaminarle dopo 24 h. Incubare il secondo terreno di coltura selettivo secondo le proprie istruzioni per l'uso.

**10 - 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>E.coli</i>	crescita scarsa con colonie incolori
<i>Enterobacter</i> spp.	crescita con colonie verde-blu
<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

**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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
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>E. aerogenes</i> ATCC 13048	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

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

**12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

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 ≥ 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 *E. aeruginosa* ATCC 13048 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<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi non target *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 8739, *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. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *A. calcoaceticus*, *A. hydrophila* e *Mucor* è inibita alla diluizione 10<sup>-1</sup>, mentre la crescita di *E. coli* è parzialmente inibita.

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

### 13 - LIMITI DEL METODO

- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. È necessario pertanto utilizzare terreni aggiuntivi per l'isolamento di *Salmonella*, quali a esempio XLD Agar.
- Sul terreno 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 dipende anche dalle richieste nutrizionali delle salmonelle ed alla resistenza agli agenti antimicrobici. È possibile che certi ceppi con particolari caratteristiche metaboliche non crescano sul terreno o crescano privi di colore (es. *Salmonella enterica* serovar Dublin cresce con colonie bianche).
- Sono necessari test appropriati per l'identificazione completa e la tipizzazione epidemiologica delle colonie

### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura e il supplemento sono destinati esclusivamente al controllo microbiologico e all'uso professionale; devono essere utilizzati da personale di laboratorio adeguatamente formato e qualificato, osservando le precauzioni approvate per i rischi biologici e utilizzando tecniche asettiche.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura
- I terreni in polvere ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene 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.
- Il supplemento liofilizzato è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante, il supplemento liquido a sterilizzazione in autoclave.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica dei flaconi dei supplementi per evitare lesioni.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).

### 15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

#### Terreno in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +2°C /+8°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).

#### Salmonella Selective Supplement II, Vial A

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; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Durante la conservazione si possono formare aghi o cristalli, che si dissolvono, con lieve agitazione, dopo aver riportate il reattivo a temperatura ambiente. Tale caratteristica non incide le prestazioni del prodotto.

#### Salmonella Selective Supplement II, Vial B

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; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto liofilo ed il prodotto ricostituito al momento dell'uso e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

#### Piastre pronte all'uso

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 2-8°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).

### 16 - BIBLIOGRAFIA













1. Pontello M, Russolo S, Carozzi F, Bottiroli U. Evaluation of a new rapid method (MUCAP Test) for the presumptive identification of *Salmonella* on primary isolation media. 5th Int. Simp. on Rapid Method and Aut. in Microb. and Immunol. Florence 4-6 nov. 1987
2. Babic-Erceg A et al. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Milan, April 24-27, 2002
3. Andreoni S. et al. *Microbiologia Medica*, 2002.





- 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
- ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella
- ISO19250:2010 Water quality — Determination of Salmonella species
- 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.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

