

**ISTRUZIONI PER L'USO****YERSINIA SELECTIVE AGAR****Piastre pronte all'uso**CIN Agar:
colonie di *Yersinia enterocolitica***1 - DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la caratterizzazione di *Yersinia enterocolitica* da campioni clinici e da altri materiali.**2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA***

Peptone	20,00 g
Estratto di lievito	2,00 g
Mannitolo	20,00 g
Sodio piruvato	2,00 g
Sodio cloruro	1,00 g
Magnesio solfato	0,01 g
Sodio desossicolato	0,50 g
Rosso neutro	0,03 g
Agar	12,00 g
Violetto cristallo	1,00 mg
Irgasan	4,00 mg
Cefsulodina	15,00 mg
Novobiocina	2,50 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 genere *Yersinia* comprende 20 specie, tra cui solo *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e alcuni ceppi di *Y. enterocolitica* rivestono un ruolo patogeno per l'uomo, mentre le altre specie sono di origine ambientale. *Y. enterocolitica* è un bacillo Gram-negativo, mobile a temperature di 22-29°C ma immobile a 37°C. La forma più comune di malattia dovuta a *Y. enterocolitica* è la gastroenterite associata al consumo di cibo o acqua contaminati.¹ *Y. enterocolitica* include un gruppo eterogeneo di ceppi, che sono tradizionalmente classificati mediante biotipizzazione in sei bio-gruppi sulla base di caratteristiche fenotipiche e, mediante sierotipizzazione, in più di 57 sierogruppi O, sulla base del loro antigene di superficie O (lipopolisaccaride o LPS). Dei sei biotipi, cinque sono riconosciuti patogeni (1B, 2-5). Il sierogruppo di *Y. enterocolitica* più frequente in molti paesi europei è il tipo O:3 seguito da O:9, mentre il sierogruppo O:8 viene rilevato principalmente negli Stati Uniti.²

Yersinia Selective Agar, noto anche come Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar, originariamente sviluppato nel 1979 da Schiemann,³ è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la caratterizzazione di *Y. enterocolitica* da campioni clinici^{1,2} e non clinici^{4,5}. Il terreno è raccomandato da ISO 10273⁴ e da FDA-BAM⁵ per la determinazione di *Y. enterocolitica* negli alimenti.

Rispetto all'agar MacConKey, all'agar CAL ed al Y Medium, l'agar CIN si è rivelato il mezzo più efficace per il recupero di *Y. enterocolitica*, inibendo quasi completamente la flora fecale, ed allo stesso tempo sostenendo una crescita rigogliosa di *Y. enterocolitica*.⁶

CIN Agar è altamente selettivo: Schiemann⁶ e Devenish⁷ hanno riportato che solo alcuni ceppi di *C. freundii*, *S. liquefaciens* ed *E. agglomerans* crescono su di esso; le colonie di questi contaminanti hanno un aspetto simile a quello di *Y. enterocolitica*.

Il peptone e l'estratto di lievito forniscono nutrienti per la crescita batterica. I batteri Gram-positivi e alcuni Gram-negativi (es. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*) sono inibiti dagli agenti selettivi presenti nel terreno: sodio desossicolato, violetto cristallo, irgasan, cefsulodin e novobiocina). Il mannitolo è presente come carboidrato fermentabile: i batteri fermentanti il mannitolo inducono l'acidificazione del terreno con precipitazione del sodio desossicolato e l'assorbimento del rosso neutro; *Y. enterocolitica* quindi coltiva con l'aspetto caratteristico delle colonie "a occhio di bua": il centro della colonia rosso intenso con un margine trasparente. I batteri che non metabolizzano il mannitolo formeranno colonie incolore.

4- CARATTERISTICHE FISICHEAspetto del terreno in piastra
pH (20-25°C)limpido di colore rosso-viola
7,4 ± 0,2**5 - MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Yersinia Selective Agar	Piastre pronte all'uso	549997	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Termostato ed altra strumentazione di laboratorio, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONIYersinia Selective Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tampone rettale^{1,2} e campioni non clinici come alimenti, mangimi e campioni della filiera alimentare^{4,5}. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la



conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.⁸ Quando possibile, raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Per la raccolta dei campioni non di origine clinica fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.^{4,5}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.

Campioni clinici

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. Le feci possono essere diluite 1: 4 in soluzione salina sterile o acqua peptonata allo 0,1%. È stato dimostrato che la diluizione riduce significativamente la quantità di flora contaminante senza compromettere l'isolamento degli agenti patogeni presenti in basso numero.²

Incubare in aerobiosi a 29-31 ° C per 24-48 ore.

Campioni della catena alimentare⁴

La procedura generale prevede:

- Semina diretta della sospensione del campione preparata in brodo di PSB * su piastra di CIN agar e incubazione a 30°C ± 1°C per 24 h ± 2 ore, oppure
- Arricchimento nel brodo PSB e nel brodo ITC ** con incubazione a 25°C ± 1°C per 44 ± 4 ore, seguito da trattamento alcalino delle colture (0,5 mL di coltura + 4,5 mL KOH 0,5% per 20 s ± 5 s) e la semina su CIN Agar (incubazione a 30°C ± 1°C per 24 h ± 2 h).
- L'utilizzatore può utilizzare un secondo terreno selettivo d'isolamento a sua scelta (ad es. Chromogenic Yersinia Agar) ***

Note

* Yersinia PSB Broth (REF 402270). ** Base di brodo Yersinia ITC REF 402265 aggiunta con supplemento di clorato di potassio (REF 4240065) e supplemento di ticarcillina irgasan antimicrobica (REF 4240060) *** Chromogenic Yersinia Agar Base (REF 408050) con supplemento Chromogenic Yersinia Supplement (REF 4240095)

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Y. enterocolitica fermenta il mannitolo e sviluppa colonie con centro rosso intenso con bordi irregolari o interi, circondati da una zona esterna che è solitamente traslucida (colonie ad "occhio di bue"). La dimensione della colonia, ed il rapporto tra il bordo e il diametro centrale variano considerevolmente tra i vari sierotipi.

I batteri mannitolo non fermentanti la cui crescita è consentita dal sistema selettivo del terreno, crescono con colonie incolori o giallo pallido.

La crescita di microrganismi non appartenenti al genere *Yersinia* è marcatamente o completamente inibita.

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.⁹

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	29-31°C / 18-24H / A	crescita, colonie con centro rosso e bordo trasparente
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	29-31°C / 44-48H / A	crescita inibita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	29-31°C / 44-48H / A	crescita inibita
<i>E.faecalis</i> ATCC 19433	29-31°C / 44-48H / A	crescita inibita

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 di Yersinia Selective Agar e delle materie prime impiegate per la produzione (terreno in polvere CIN Agar Base preparato in piastra con l'aggiunta di Yersinia Selective Supplement) vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento lotti precedentemente approvati e considerati come Lotti di Riferimento.

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con il ceppo target *Y. enterocolitica* ATCC 23715. Le piastre del lotto in esame (TB) e del lotto di riferimento (RB), sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di sospensioni delle colonie del ceppo target. Dopo incubazione a 29-31°C per 18-24 ore in aerobiosi, vengono contate le colonie sviluppate sui due lotti e calcolato l'indice di produttività ($Pr = \text{UFC}_{\text{TB}} / \text{UFC}_{\text{RB}}$). Nel caso *Pr* sia superiore o uguale a 0,7 e le colonie mostrino il caratteristico aspetto "ad occhio di bue", i risultati sono giudicati conformi.

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con *Y. enterocolitica* ATCC 9610 e *Y. enterocolitica* DSM 13030. Dopo incubazione a 29-31°C per 18-24 h in atmosfera in aerobiosi si osserva l'entità della crescita. Viene valutata la carica microbica e la morfologia di questi ceppi target 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 appropriate diluizioni di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target: *S. marcescens* ATCC 8100, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212. Dopo incubazione, *S. marcescens* risulta parzialmente inibita mentre gli altri ceppi non target sono completamente inibiti.

12 - LIMITI DEL METODO

- In caso di crescita densa e compatta, la dimensione delle colonie di *Y. enterocolitica* può essere più piccola e il tipico centro rosso può essere poco chiaro o assente.⁴
- *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* crescono bene sul terreno ed essendo mannitolo fermentanti, sviluppano colonie del tutto simili a quelle di *Y. enterocolitica*.¹⁰
- *Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* non sono inibiti dagli agenti selettivi del terreno; *Serratia* ed *Enterobacter* sviluppano colonie rilevate, mucoidi, con una diffusa pigmentazione rosa, anche se, occasionalmente possono essere confuse con le colonie di *Y. enterocolitica*. *Citrobacter* sviluppa le colonie più simili a quelle di *Yersinia* e non possono essere distinte solo con le caratteristiche morfologiche.¹⁰
- La maggior parte dei ceppi di *Y. pseudotuberculosis* è inibita dalla concentrazione di 15 mg/L di cefsulodina.¹¹





- Alcuni ceppi di *Y. enterocolitica* serovar O3 non crescono su CIN Agar.¹¹
- 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.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 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 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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 tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, 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. 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).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Kingry LC, Tarr CL, Petersen MJ. *Yersinia*. In In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019
2. Public Health England. Investigations of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. UK Standards for Microbiology Investigations. 2014. B 30 Issue 8.1.
3. Schiemann D A. Synthesis of a selective agar for *Yersinia enterocolitica*. Can J Microbiol 1979; 25(11):1298-1304,
4. ISO 10273:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 8: *Yersinia enterocolitica*. Rev 10/2017
6. Head CB, Whitty DH, Ratnam S. Comparative Study of Selective Media for Recovery of *Yersinia enterocolitica*. J Clin Microbiol 1982;16:615.
7. Schiemann DA. Development of a Two-Step Enrichment Procedure for Recovery of *Yersinia enterocolitica* from Food. Appl Environ Microbiol 1982; 43 :14-27
8. McElvania E, Singh K. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
9. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
10. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
11. Fukushima H, Gomyoda M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* Biotype 3B Serotype O3 Inhibited on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar. J Clin Microbiol 1986, 24:116-120

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	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2020
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

