

**ISTRUZIONI PER L'USO****SS AGAR**
Piastrre pronte all'usoSS Agar:
Salmonella arizonae colonie con centro nero**1 - DESTINAZIONE D'USO**

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

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

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
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

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 Leifson¹ nel 1935, sperimentata con successo da Catherine Mayfield e Maud Gober² 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*.^{3,4} Per l'isolamento di *Shigella* spp. i terreni per l'isolamento primario raccomandati sono Hektoen Enteric Agar o XLD Agar.⁵

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

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 H₂S gassoso che, reagendo con il ferro ammonio citrato, forma un precipitato che da luogo a colonie nere o con un centro nero.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO I

Aspetto del terreno in piastra
pH finale a 20-25°C

rosso arancio, limpido o leggermente opalescente
7,0 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
SS Agar CND:W0104010405; EDMA:14.01.04.01; RDM: 1455545/R	Piastrre pronte all'uso	542075	2 x 10 piastrre ø 90 mm 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 strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

SS Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tampone rettale^{5,6}. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni.⁷

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastrre 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 una 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.^{5,7}





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.

9 - 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, H₂S positivo: probabile presenza di *Salmonella*.

Colonie lisce, opache, incolori, senza centro nero: ceppo lattosio non fermentante, H₂S negativo: probabile presenza di *Salmonella* H₂S 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* H₂S positivi possono crescere con colonie incolori con centro nero o grigio-nero, nel caso vi sia una mescolanza di colonie di *Proteus* e di *Salmonella* H₂S 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 C₈ esterasi, tipico di *Salmonella* spp.⁸

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. E' comunque responsabilità 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>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 incolori
<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 registrate 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 di SS Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere SS Agar REF 402075) 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* NCTC 5188, *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 incolori con centro nero, le colonie di *Shigella* si presentano incolori; 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 10⁻¹ a 10⁻⁴ di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 di un ceppo non target Gram positivo (*E.faecalis* ATCC 29212) e diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁶ 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 10⁻¹, 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

- Le colonie di *Proteus* spp. possono mimare le caratteristiche colturali di *Salmonella*.⁶ La differenziazione tra *Proteus* e *Salmonella* può essere effettuata rapidamente sulla piastra, con il reattivo MUCAP Test.⁸
- 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.⁵
- 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.

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 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.
- 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. Smaltire 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.
- 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. Questo vale anche in relazione a eventuali diritti di terzi. 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. 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	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020

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

