

**ISTRUZIONI PER L'USO**

# CHOCOLATE AGAR BACITRACIN

## Piastre pronte all'uso

### 1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento di *Haemophilus* spp. da campioni clinici contenenti flora mista.



Chocolate Agar Bacitracin:  
colonie di *Haemophilus influenzae*

### 2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA \*

Peptocomplex	15,00 g
Amido di grano	1,00 g
Dipotassio idrogeno fosfato	4,00 g
Potassio diidrogeno fosfato	1,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Agar	12,00 g
Bacitracina	20.000 UI
Vancomicina	5,00 mg
Sangue defibrinato di cavallo scaldato a 80°C	70,00 mL
Acqua purificata	1000 mL
<b>Biovitex Enrichment Supplement</b>	
Nicotinamide adenin dinucleotide (NAD)	2,50 mg
Cocarbossilasi	1,00 mg
Acido p-aminobenzoico	0,13 mg
Tiamina	0,03 mg
Vitamina B12	0,10 mg
L-glutamina	100,00 mg
L-cistina	11,00 mg
L-cisteina HCl	259,00 mg
Adenina	10,00 mg
Guanina HCl	0,30 mg
Ferro nitrato,6H2O	0,20 mg
Glucosio	1,00 g

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

### 3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

*Haemophilus influenzae* è un bacillo Gram-negativo con particolari esigenze nutritive che si trova frequentemente nelle vie aeree superiori. Oltre a varie infezioni sistemiche, *H. influenzae* è una causa comune di gravi malattie del tratto respiratorio superiore e inferiore. Nel 1969 Hovig e Aandahl<sup>1</sup> formularono un terreno selettivo per l'isolamento di *Haemophilus* spp. da campioni delle vie respiratorie, incorporando bacitracina 300 mg /L nell'agar cioccolato. L'uso del terreno selettivo ha aumentato il tasso di isolamento di *Haemophilus* spp. da tutti i campioni esaminati: per i tamponi nasali la percentuale di isolamento è aumentata dal 32% al 41,3%, per i tamponi faringei dal 30,7% al 98,7% per i campioni di espettorato dal 3,4% al 61,4% .<sup>1</sup>

Chocolate Agar Bacitracin è un terreno selettivo preparato con GC Medium Base, addizionato di sangue riscaldato di cavallo, Biovitex e bacitracina, per l'isolamento di *Haemophilus* spp. da campioni clinici contaminati da batteri commensali.<sup>2-4</sup>

Il Peptocomplex fornisce carbonio, azoto ed oligoelementi per la crescita batterica, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico, il tampone fosfato dibasico e monobasico previene i cambiamenti di pH dovuti alla produzione di ammine, l'amido di mais è incluso per assorbire i sottoprodotti tossici contenuti nel campione ed è una fonte di energia per la crescita batterica. Il sangue di cavallo riscaldato fornisce emina (fattore X) necessaria per la crescita di *Haemophilus* spp. Il terreno è arricchito con Biovitex che fornisce vitamine, fattore V (NAD), aminoacidi, coenzimi, glucosio, ioni ferro e altri fattori che migliorano la crescita delle specie che richiedono il fattore V per la crescita: *H. influenzae*, *H. ducrey*, *H. aegyptius*, *H. haemolyticus*.<sup>2</sup> La bacitracina sopprime la crescita della maggior parte dei ceppi di streptococchi, stafilococchi, micrococchi e *Neisseria*, la vancomicina è attiva contro i batteri Gram positivi.

### 4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	marrone scuro, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,2 ± 0,2

### 5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chocolate Agar Bacitracin CND: W0104010405, EDMA: 14.01.04.01; RDM:1443740/R	Piastre pronte all'uso	541519	2 x 10 piastre 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, materiali per la generazione di una atmosfera di incubazione controllata, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

### 7 - CAMPIONI

Le piastre di Chocolate Agar Bacitracin possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici umani raccolti da siti non sterili quali l'orecchio e le vie respiratorie.<sup>2-4</sup> Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.<sup>3-5</sup>





## 8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. 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.

Incubare a 35-37°C in atmosfera umida in presenza del 5-10% di CO<sub>2</sub> e registrare i risultati dopo 24 e 44-48 ore, per ottenere una crescita soddisfacente di *H. influenzae* e della maggior parte delle altre specie di *Haemophilus*. Quando vengono seminati campioni per la ricerca di *H.aegyptius* ed *H.ducreyi*, può essere necessario incubare fino a 5 giorni.<sup>2</sup> Inoltre, quando si sospetta *H.ducreyi* nel campione, le piastre devono essere incubate a 30-33°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> in un ambiente ad alta umidità.<sup>2</sup>

## 9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

La morfologia delle colonie di *Haemophilus* spp è qui riassunta.<sup>2</sup>

Le colonie di *Haemophilus influenzae* hanno un diametro di circa 1-2 mm, sono lisce, basse, convesse, grigiastre e traslucide, con un caratteristico odore "di topo" (ceppi che non producono indolo) o con forte odore di amine, per i ceppi che producono indolo.

Le colonie di *H.parainfluenzae* sono in genere da bianco sporco a giallo e, come per *H.influenzae*, da 1 a 2 mm di diametro. L'aspetto della colonia è piuttosto variabile.

Le colonie di *H.aegyptius* raggiungono una dimensione di 0,5 mm dopo 48 ore di incubazione; le colonie sono basse, convesse, traslucide con l'intera superficie liscia.

Le colonie di *H.haemolyticus* sono traslucide, lisce e convesse.

Le colonie di *H.ducreyi* sono piccole, piatte, grigie e lisce.

## 10 - CONTROLLO DI 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 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>H.influenzae</i> ATCC 10211	35-37°C / 18-24H / CO <sub>2</sub>	buona crescita
<i>S.pyogenes</i> ATCC 19615	35-37°C / 44-48H / CO <sub>2</sub>	crescita inibita

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 Chocolate Agar Bacitracin sono testati per la produttività e la selettività.

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con *H.influenzae* ATCC 10211 ed *H.influenzae* ATCC 49247. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h in atmosfera al 5-10% di CO<sub>2</sub> ore si osserva l'entità della crescita. I ceppi target mostrano una buona crescita.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni appropriate di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non-target: *S.pyogenes* ATCC 19615 e *S.aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48 ore in atmosfera con 5-10% di CO<sub>2</sub> la crescita dei ceppi non-target risulta completamente inibita.

## 12 - LIMITI DEL METODO

- A volte, nel terreno può essere osservata la presenza di piccole particelle. Questo fenomeno non influisce sulle prestazioni del terreno.
- Su questo terreno possono crescere *E.coli*, alcune specie di *Neisseria* e *Candida*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* spp., così come altri batteri Gram negativi.
- 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](http://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](http://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

- Hovig B, Aandahl EH. A selective method for the isolation of Haemophilus in material from the respiratory tract. Acta Pathol Microb Scand 1969; 77:676-84
- Gonzales MD, Ledebner NA. Haemophilus. In Carroll KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
- Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI) Investigation of Ear Infections and Associated Specimens. B 1 Issue 9, 2014
- Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI) Investigation of bronchoalveolar lavage, sputum and associated specimens B 57, Issue n° 3.5, 2019
- McElvania E, Singh K. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Carroll KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.

#### 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 4	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.

