

**ISTRUZIONI PER L'USO****ROGOSA BIOS AGAR****Piastre pronte all'uso***L.rhamnosus* su Rogosa Bios Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno di coltura per l'isolamento selettivo ed il conteggio dei lattobacilli da campioni clinici ed alimenti.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptozimatic	2.00 g
Triptone	4.00 g
Estratto di lievito	9.00 g
Glucosio	10.00 g
Arabinosio	5.00 g
Saccarosio	5.00 g
Sodio acetato	15.00 g
Ammonio citrato	2.00 g
Potassio fosfato monobasico	6.00 g
Magnesio solfato	0.57 g
Manganese solfato	0.12 g
Ferro solfato	0.03 g
Agar	15.00 g
Tween 80	1.00 mL
Acido acetico	1.32 mL
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

I lattobacilli sono batteri Gram-positivi a forma di bastoncino, non sporigeni, anaerobi aerotolleranti o microaerofili. I lattobacilli sono membri comuni del microbiota umano, presenti in numerosi siti del corpo, come la cavità orale, il tratto gastrointestinale ed il sistema genitale femminile, tuttavia, anche se raramente, possono agire come patogeni opportunistici sia nei bambini che negli adulti.¹

I lattobacilli sono associati alla carie dentale avanzata dove sono considerati come colonizzatori secondari ma probabilmente svolgono un ruolo nell'esacerbare lesioni esistenti ed inoltre sono stati associati ad una moltitudine di infezioni tra cui batteriemia, endocardite, peritonite, corioamnionite, meningite e ascessi intra-addominali.¹ La riduzione dei lattobacilli nel microbiota vaginale e l'instaurarsi di una maggiore diversità batterica, sono caratteristiche della vaginosi batterica.¹

Rogosa Bios Agar è preparato secondo una modifica della formula proposta da Rogosa, Mitchell e Wiseman^{2,3} ed è impiegato per l'isolamento ed il conteggio dei lattobacilli in campioni clinici ed alimenti.^{1,4,5}

Il terreno contiene due peptoni ed estratto di lievito come fonti di azoto, carbonio e vitamine, necessari per la crescita microbica. Glucosio, arabinosio e saccarosio forniscono carbonio e sono fonti di energia. Tween 80 agisce come tensioattivo e fornisce acidi grassi necessari per il metabolismo dei lattobacilli. L'ammonio citrato ed il sodio acetato inibiscono la crescita di streptococchi, muffe e altri organismi della flora microbica orale e limitano la sciamatura di *Proteus*. Il potassio diidrogeno fosfato è un agente tamponante, il magnesio solfato, il ferro solfato ed il manganese solfato sono fonti di ioni inorganici per la crescita ottimale dei lattobacilli. L'acido acetico riduce il pH del mezzo a valori acidi.

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	marrone chiaro, limpido
pH finale a 20-25 °C	5,4 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rogosa Bios Agar CND: W0104010405, EDMA: 14.01.04.01 EDMA: RDM: 1446002/R	Piastre pronte all'uso	541985	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, giare e materiali per l'incubazione in condizioni controllate, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Le piastre Rogosa Bios Agar possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici come feci, saliva, campioni vaginali.^{4,5} Quando possibile, raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le buone pratiche di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici. Consultare la bibliografia per ulteriori informazioni.¹

Rogosa Bios Agar può essere utilizzato per l'esame degli alimenti: per informazioni dettagliate, consultare i metodi standard appropriati.⁶ Il terreno non è adatto per l'isolamento dei lattobacilli dal latte.⁴

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. Inoculare e strisciare il campione con un'ansa sui quattro quadranti della piastra per ottenere colonie ben isolate, assicurandosi che le sezioni 1 e 4 non si sovrappongano. 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. Per valutazioni quantitative utilizzare tecniche di inoculo appropriate.





Incubare per 3 giorni a 35°C o per 5 giorni a 30°C.² I lattobacilli preferiscono un'atmosfera microaerofila, pertanto alcuni autori raccomandano un'incubazione in un'atmosfera arricchita di CO₂ al 5-10% o in condizioni anaerobiche.^{2,3,4}

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie. I lattobacilli si presentano con colonie grandi (2-3 mm di diametro), biancastre, lisce e circolari.

Anche altri batteri lattici possono crescere su questo terreno e produrre colonie simili. La maggior parte degli altri microrganismi sono inibiti sebbene enterococchi e pediococchi possano mostrare una crescita ritardata. Sia gli enterococchi che i pediococchi producono colonie molto piccole con un diametro compreso tra 0,5 e 1,0 mm.

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 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>L.rhamnosus</i> ATCC 7469	35-37°C / 44-48 H / CO ₂	crescita
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 44-48 H / CO ₂	inibito

CO₂: atmosfera con 5-10% di CO₂; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo dei lotti di produzione di piastre di Rogosa Bios Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Rogosa Bios Agar REF 401985) sono valutati per la produttività e la selettività.

La produttività è valutata con metodo quantitativo e con tecnica ecometrica semiquantitativa, inoculando le piastre con i ceppi-target *L.plantarum* ATCC 8014, *L.rhamnosus* ATCC 7469, *L.gasseri* ATCC 19992, *L.acidophilus* ATCC 314. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48°C, in atmosfera con 5-10% di CO₂, i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie grigie.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato ed in ecometria, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione con torbidità pari a McFarland 0,5 di *S.lactis* ATCC 11454, *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212, *S.aureus* ATCC 25923 and *C.albicans* ATCC 10231. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48°C, in atmosfera con 5-10% di CO₂, la crescita di *S.lactis*, *E.coli* e *S.aureus* è totalmente inibita, mentre *E.faecalis* e *C.albicans* sono parzialmente inibiti.

12 - LIMITI DEL METODO

- In generale, le specie di *Lactobacillus* coltivano selettivamente su terreni con pH acido come Rogosa agar, sebbene alcuni ceppi più esigenti potrebbero non crescere su questi terreni.¹
- Si consiglia di inoculare, insieme a Rogosa Bios Agar, anche terreni convenzionali al sangue.¹
- Il terreno non è consigliato per il mantenimento dei lattobacilli; trasferire le colonie per ulteriori test il prima possibile.⁴
- Il contenuto salino della formulazione rende il terreno non adatto per l'isolamento dei lattobacilli dal latte: *L.lactis*, *L.bulgaricus* e *L.helveticus*.⁴
- Su questo terreno possono crescere altri microrganismi come enterococchi, pediococchi e *Leuconostoc*.
- 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. 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. Butler-Wu SM, She RC. *Actinomyces, Lactobacillus, Cutibacterium* and other non-spore-forming Gram-positive rods. In Carrol KC, Pfaller MA *et al.* editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
2. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. J Bact 1951; 62:132
3. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. J Dent Res 1951; 30(5):682
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. Atlas R, Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition. CRC Press, 1997.
6. Hall, Ledenbach and Flowers. In Downes and Ito (ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2001.

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 2	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	12/2020

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

