

**ISTRUZIONI PER L'USO****SUPPLEMENTED BRUCELLA AGAR****Piastre pronte all'uso**

Supplemented Brucella Agar:
Bacteroides fragilis e striscia di cefoxitina

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno di coltura per la determinazione quantitativa della suscettibilità degli anaerobi agli agenti antimicrobici mediante strisce a gradiente.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Tryptone	10,0 g
Peptone	10,0 g
Estratto di lievito	2,0 g
Glucosio	1,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio bisolfito	0,1 g
Agar	15,0 g
Vitamina K1	1,0 mg
Emina	1,0 mg
Sangue lisato di cavallo	50,0 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 metodi di riferimento per i test di sensibilità dei batteri anaerobi sono l'agar-diluizione e la micro-diluizione in brodo, descritti nel documento pubblicato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹.

Secondo le linee guida internazionali, questi metodi di riferimento sono molto costosi, laboriosi e richiedono personale tecnico esperto². Per superare questi limiti sono stati sviluppati e resi disponibili per il laboratorio metodi alternativi, basati su strisce con gradiente di agente antimicrobico. Tali test si basano sul trasferimento e sulla diffusione di un gradiente a concentrazione stabile di un antibiotico da una striscia di plastica o di carta su terreno solido in piastra. Il terreno indicato per la determinazione della CMI degli anaerobi con strisce a gradiente è il Brucella Agar addizionato di vitamina K1, emina e sangue lisato di cavallo o di montone³.

Supplemented Brucella Agar deriva dalla formulazione raccomandata da CLSI per il metodo delle microdiluizione in brodo¹ e contiene sangue lisato di cavallo.

Nel Supplemented Brucella Agar, i peptoni e l'estratto di lievito, insieme al glucosio, forniscono azoto, carbonio e vitamine per la crescita microbica. Il sangue lisato di cavallo fornisce nutrienti aggiuntivi. Il sodio bisolfito abbassa il potenziale redox a valori adatti per gli anaerobi stretti. Sia l'emina che la vitamina K1 intensificano la crescita di alcuni batteri anaerobi.

Studi comparativi delle prestazioni del metodo con strisce a gradiente rispetto al metodo CLSI delle diluizione in agar hanno mostrato generalmente una elevata concordanza di risultati per molte specie di anaerobi, con una varietà di antibiotici.⁴⁻⁸ Il metodo a strisce con gradiente si è dimostrato utile anche per la rilevazione dei ceppi eteroresistenti (es. nel caso della resistenza all'imipenem di *B. fragilis* o nel caso della resistenza al metronidazolo di *C. difficile* e *B. fragilis*).^{2,9,10}

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto del terreno	rosso, trasparente
pH finale a 20-25 °C	7,2 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Supplemented Brucella Agar CND: W0104010403 EDMA: 14.01.04.0; RDM: 1455558/R	Piastre pronte all'uso	549850	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, strisce a gradiente con antimicrobici.

7 - CAMPIONI

Il test di sensibilità con strisce a gradiente è effettuato su colture pure di batteri anaerobi, isolati da campioni clinici. Supplemented Brucella Agar non è adatto all'isolamento microbico direttamente da campioni clinici.

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre e le strisce a temperatura ambiente; la superficie dell'agar deve essere asciutta prima dell'uso.

Linee guida per la preparazione dell'inoculo:

Preparare una sospensione batterica in Brucella Broth o Mueller Hinton Broth con una torbidità equivalente a McFarland 1.

Immergere un tampone di cotone sterile nella sospensione e rimuovere il liquido in eccesso premendo e ruotando il tampone contro l'interno della provetta.

Con il tampone di cotone inoculare la piastra facendo uso di un inoculatore rotante automatico o strisciando manualmente su tutta la superficie del terreno avendo cura di verificare che non vi siano zone della piastra prive di inoculo.

Non appena l'inoculo è stato assorbito e la superficie dell'agar è asciutta, applicare le strisce a gradiente. Assicurarsi che le strisce siano a completo contatto con la superficie dell'agar e non devono essere spostate una volta applicate poiché la diffusione iniziale degli agenti





antimicrobici dalle strisce è molto rapida. Le strisce devono essere collocate sulla piastra in modo da non creare zone di inibizione sovrapposte.

Linee guida per l'incubazione:

Incubare a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 24-48-72 ore (a seconda della specie) in anaerobiosi (80-85% N_2 /10% CO_2 /10% H_2).

Per i dettagli sulle procedure di inoculo ed incubazione, consultare le istruzioni per l'uso del produttore delle strisce a gradiente.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, leggere le piastre dalla parte anteriore con il coperchio rimosso e con luce riflessa.

Un inoculo corretto e piastre seminate in modo soddisfacente dovrebbero dare come risultato un tappeto di crescita confluenta. Se fossero visibili singole colonie, l'inoculo è inadeguato ed il test deve essere ripetuto.

La crescita deve essere distribuita uniformemente sulla superficie dell'agar per ottenere un'ellisse di inibizione uniforme.

Leggere la CMI del ceppo di controllo e dei ceppi in esame dove l'ellisse di inibizione interseca la scala numerica della striscia.

Verificare che i risultati per il ceppo di controllo rientrino negli intervalli di accettabilità.

Per specifiche istruzioni di lettura ed interpretazione dei risultati consultare le istruzioni per l'uso del produttore delle strisce.

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 comune responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle istruzioni fornite dal produttore delle strisce a gradiente, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Come minimo, deve essere testato almeno un ceppo per garantire la corretta funzionalità del metodo.⁴

A titolo esemplificativo, qui di seguito sono riportati ceppo e striscia a gradiente, utili per il controllo di qualità.

B.fragilis ATCC 25285 / metronidazolo

Per i dettagli sulla scelta delle strisce, dei ceppi di controllo e degli intervalli di accettabilità, consultare le istruzioni per l'uso del produttore delle strisce.

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 Supplemented Brucella Agar sono testati mediante il test di sensibilità antimicrobica, secondo le istruzioni per l'uso del produttore delle strisce con i seguenti ceppi e strisce con antimicrobici: *B.fragilis* ATCC 25285 / metronidazolo, cefoxitina, benzilpenicillina, imipenem.

Dopo l'incubazione a $35-37^\circ\text{C}$ in anaerobiosi per 48 ore, la CMI viene letta nel punto in cui l'ellisse di inibizione interseca la scala a gradiente; le misure vengono registrate e valutate in riferimento agli intervalli di accettabilità riportati sulle istruzioni per l'uso del produttore delle strisce.

12 - LIMITI DEL METODO

- Una concentrazione errata dell'inoculo, la conservazione impropria dei dischi con antimicrobici, la conservazione impropria delle piastre con conseguente modifica dello strato del terreno e del pH, l'umidità eccessiva delle piastre, misurazioni scorrette delle zone di inibizione, sono tutti elementi che possono produrre risultati errati.
- I metodi di semina, incubazione e lettura qui descritti devono essere considerati come linee guida; per garantire risultati affidabili è richiesta la stretta aderenza al protocollo suggerito dal produttore delle strisce a gradiente.
- La lettura e l'interpretazione dei risultati richiedono esperienza e l'attenta osservanza delle istruzioni del produttore delle strisce; occasionalmente, alcune combinazioni di antibiotici/batteri possono dare risultati insoliti. In questi casi, la lettura della CMI può essere difficile per personale inesperto.³
- Il terreno in piastra qui descritto è da intendersi come un ausilio alle scelte terapeutiche per le infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati del test di sensibilità agli antimicrobici 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.
- 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. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 8th ed. CLSI document M11-A9, . Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2012.
2. Gajdács M, Spengler G, Urbán E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology. Antibiotics (Basel) 2017;6(4):25.
3. Etest Application Guide-16273B - en - 2012/07 /Etest IFU 9392553C en 2012/01
4. Schuetz A, Carpenter DE. Susceptibility test method: anaerobic bacteria *In*: Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
5. Bolmström A, Karlsson A, Engelhardt A, Phion Ho P, Petersen PJ, Bradford PA, Hal Jones C. Validation and reproducibility assessment of tigecycline MIC determinations by Etest. J Clin Microbiol. 2007; 45(8):2474-9.
6. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol 1991; 29(10):2197-203.
7. Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 1995; 22(3):279-84.
8. Poulet P, Duffaut D, Lodter JP. Evaluation of the Etest for determining the in-vitro susceptibilities of Prevotella intermedia isolates to metronidazole J Antimicrob Chemother 1999;43(4):610-1.
9. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. Clin. Microbiol. Rev. 2015; 28: 191–207.
10. Huang H, Weintraub A, Fang H, Wu S, Zhang Y, Nord CE. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese Clostridium difficile strains. Anaerobe 2010; 16: 633–635.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o 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	01/2021

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

