

ISTRUZIONI PER L'USO

SCHAEDLER SELECTIVE BLOOD AGAR

Piastre pronte all'uso


Bacteroides fragilis su Schaedler Selective Blood Agar

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento dei batteri anaerobi Gram-negativi da campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Digerito pancreatico di caseina	5,7 g
Digerito enzimatico di soia	1,0 g
Sodio cloruro	1,7 g
Dipotassio idrogeno fosfato	0,8 g
Peptone speciale	5,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Glucosio	5,8 g
Cisteina HCl	0,4 g
Emina	0,01 g
Tampone Tris	0,75 g
Agar	13,5 g
Vitamina K1	10 mg
Kanamicina	100 mg
Vancomicina	7.5 mg
Sangue defibrinato di montone	50 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

Schaedler Selective Blood Agar è basato su una modifica di Mata, Carillo e Villatoro¹ della formulazione del terreno di base proposta da Schaedler, Dubos e Costello². La modifica, valutata nei loro studi sulla microflora fecale umana anaerobica, consisteva nella sostituzione del digerito pancreatico di caseina con 1% di Tryptic Soy Broth.

L'uso dell'aminoglicoside paromomicina 100 mg/L insieme a vancomicina 7.5 mg/L è stato descritto per la prima volta da Finegold *et al.*³ nel 1965 e riportato nel NCDC Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology⁴. La formulazione attuale del terreno contiene la kanamicina in sostituzione della paromomicina.⁵

La piastra di agar sangue con kanamicina-vancomicina, utilizzata in combinazione con un terreno non selettivo, è raccomandata per la rilevazione di bacilli anaerobi Gram-negativi, in particolare *Bacteroides* e *Prevotella*, in campioni clinici.⁶

I peptoni forniscono carbonio, azoto e oligoelementi per la crescita batterica, il cloruro di sodio fornisce elettroliti essenziali e mantiene l'equilibrio osmotico. L'estratto di lievito, l'emina, la vitamina K1 ed il sangue di montone, consentono la crescita degli anaerobi obbligati e facoltativi più esigenti. Il glucosio è una fonte di energia ed un agente riducente; la cisteina è anch'essa un agente riducente ed inoltre inibisce la crescita di *E. coli*.⁷ Il tampone Tris ed il potassio fosfato bibasico sono utilizzati per prevenire la diminuzione del pH durante la fermentazione del glucosio. La kanamicina sopprime la crescita dei batteri Gram-negativi aerobi ed anaerobi facoltativi, mentre la vancomicina è attiva contro i batteri Gram-positivi.

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	rosso, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,6 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Schaedler Selective Blood Agar CND: W0104010405; EDMA: 14.01.04.01; RDM: 1455335/R	Piastre pronte all'uso	549989	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 e giare per l'incubazione in anaerobiosi, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Schaedler Selective Blood Agar può essere inoculato direttamente con campioni clinici come biopsie, aspirati (ad es. liquido cerebrospinale, fluidi articolari e pus), essudati del canale radicolare dentale e placca sottogengivale.⁶ 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.⁸ I campioni devono essere trasportati in laboratorio in condizioni anaerobiche e processati entro 24 ore.⁶

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. Inoculare il campione il prima possibile dopo la raccolta. 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 in condizioni anaerobiche a 35-37°C per almeno 40-48 ore o più (fino a 7 giorni) a seconda del tipo di campione o dell' microrganismo/i sospetto/i. Un periodo di incubazione di 48 ore rileva la presenza di ceppi a rapida crescita, come *Bacteroides* spp. Si consiglia una re-incubazione da 5 a 7 giorni poiché alcune specie come *Bilophila*, *Desulfovibrio* e *Porphyromonas*, potrebbero non essere rilevate con una breve incubazione richiedendo almeno 4-5 giorni per la crescita.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie. Batteri anaerobi diversi crescono con colonie di diversa morfologia; è richiesta una prova di conferma.

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.⁹

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	35-37 °C / 24-48 H / AN	crescita
<i>P.mirabilis</i>	ATCC 12453	35-37 °C / 24-48 H / AN	inibito
<i>E.faecalis</i>	ATCC 29212	35-37 °C / 24-48 H / AN	inibito

AN: anaerobiosi; 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 Schaedler Selective Agar sono valutati per la produttività e la selettività.

La produttività è valutata con tecnica ecometrica semiquantitativa, inoculando le piastre con i ceppi-target *B.fragilis* ATCC 25285 e *F.nucleatum* ATCC 25586. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48°C, in atmosfera anaerobica, i ceppi target mostrano una buona crescita.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione con torbidità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non-target *C.perfringens* ATCC 13124, *P.anaerobius* ATCC 27337, *E.faecalis* ATCC 29212, *P.mirabilis* ATCC 12453. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48 ore in anaerobiosi, si osserva e si registra la crescita dei ceppi non target: *E.faecalis*, *P.mirabilis* e *P.anaerobius* sono totalmente inibiti, mentre *C.perfringens* è parzialmente o totalmente inibito.

12 - LIMITI DEL METODO

- È consigliabile seminare insieme a Schaedler Selective Blood Agar altri terreni non selettivi e selettivi: Columbia Blood Agar incubato in aerobiosi con 5-10% di CO₂, sul quale cresceranno solo gli anaerobi facoltativi, Schaedler Blood Agar incubato in anaerobiosi, sul quale cresceranno tutti gli anaerobi stretti e Schaedler Selective CNA Blood Agar, sul quale cresceranno gli anaerobi stretti Gram positivi. La comparazione delle crescite sui quattro terreni può essere d'aiuto alla determinazione dei microrganismi presenti nel campione.
- L'uso combinato di un terreno selettivo e di un terreno non selettivo aumenta la resa e fa risparmiare tempo in termini di isolamento e riconoscimento delle colonie.⁶
- La presenza di vancomicina 7,5 mg/L può essere inibitoria per alcuni ceppi di *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.¹⁰
- Le piastre non devono essere esposte all'aria durante le prime 48 ore di incubazione per evitare la perdita delle specie più sensibili all'ossigeno.⁶
- In molte infezioni croniche, se non in tutte, possono essere presenti diversi filotipi di anaerobi Gram-negativi non coltivabili.⁶
- La crescita su Schaedler Selective Blood Agar dipende dai requisiti metabolici di ogni singolo microrganismo; alcuni ceppi target, con requisiti specifici, potrebbero non crescere sul terreno.
- 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. Mata LJ, Carrillo C, Villatoro EF. Fecal microflora in healthy persons in a preindustrial region. *Appl Microbiol* 1969; 17: 596-599
2. Schaedler RW, Dubos R, Castello R. The development of bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J Exp Med* 1965; 122: 59-66.
3. Finegold SM, AB Miller, Posnick DJ. Further studies on selective media for *Bacteroides* and other anaerobes. *Ernährungsforschung* 1965; 10:517-528.
4. Dowell, VR, Hawkins TM. Laboratory Methods in Anaerobic bacteriology, NCDC Laboratory Manual. Public Health Service Publication n° 1803, June 1968.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
6. Conrads G, Nagy E, Kononen E. Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium and other anaerobic Gram negative rods. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
7. Kari C, Nagy Z, Kovacs P and Hernadi F. Mechanism of the growth inhibitory effect of cysteine on Escherichia coli. *J Gen Microbiol* 1971; 68:349-356.
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. Australian Society for Microbiology: Guidelines for assuring quality of medical microbiological culture media. 2nd Ed, July 2012.
10. Jousimies-Somer HR. et al. Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, and other anaerobic Gram-negative bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (editors). Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003.

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	11/2020

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

