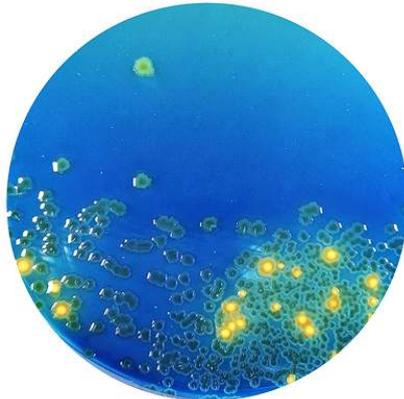


**ISTRUZIONI PER L'USO****DRIGALSKI LACTOSE AGAR**

Terreno in polvere



Drigalski Lactose Agar:
E.coli (colonie gialle), *S.Typhimurium* (colonie verdastre)

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento delle *Enterobacteriaceae* e di altri batteri Gram negativi da campioni clinici.

2 - FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Peptone	15 g
Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3 g
Sodio desossicolato	1 g
Sodio tiosolfato	1 g
Lattosio	15 g
Agar	13 g
Violetto cristallo	5 mg
Blu di bromotimolo	80 mg

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

A Wilhelm von Drigalski ed a Heinrich Conradi si deve la scoperta, nel 1902, dell'azione inibitoria del violetto cristallo sulla crescita dei batteri Gram positivi e lo sviluppo di un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento di *B.typhi*. Il terreno Drigalski Conradi, modificato più volte nel corso degli anni, è la formulazione su cui si basa l'attuale Drigalski Lactose Agar, ancora ampiamente utilizzato per l'isolamento delle *Enterobacteriaceae* e di altri batteri Gram negativi non fermentanti da campioni clinici quali l'urina, le feci, ed altri materiali biologici.¹

È stato descritto l'impiego del Drigalski Lactose Agar con l'aggiunta di cefalosporine, per l'isolamento degli enterobatteri produttori di beta lattamasi a spettro esteso^{2,3} e, con l'aggiunta di carbapenemi, per l'isolamento di enterobatteri produttori di carbapenemasi⁴.

Il peptone, l'estratto di carne e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, minerali e vitamine, necessari allo sviluppo della crescita microbica. I composti selettivi del terreno sono il sodio desossicolato, il violetto cristallo ed il sodio tiosolfato che hanno una attività inibitoria verso i batteri Gram positivi; il lattosio è un carboidrato fermentabile da parte di *Escherichia coli* e di altri coliformi con formazione di acidità, messa in evidenza dal blu di bromo timolo, un indicatore di pH che si presenta di colore verde in ambiente leggermente acido o neutro, giallo in ambiente molto acido, blu in ambiente alcalino.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 51 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 115 °C per 20 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	limpido, verde
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Drigalski Lactose Agar	Terreno di coltura in polvere	4013302	500 g (9,8 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Possono essere utilizzati urina, feci, ed altri materiali biologici. Seguire le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre 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.

Incubare a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

I batteri Gram negativi crescono con caratteristiche differenti in funzione della loro capacità di fermentare il lattosio e di indurre il viraggio dell'indicatore.

E. coli, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*: fermentano il lattosio con produzione di acidi e crescono con colonie gialle o giallo-verde con, a volte, un alone opaco di colore giallo.

Salmonella, *Shigella*, *Proteus*, *Alkaligenes*, *Pseudomonas* non fermentano il lattosio e crescono con colonie dal grigio al verde-blu.





11 - CONTROLLO QUALITÀ

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 facoltà 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>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37°C / 18 H / A	crescita, colonie gialle
<i>S. Enteritidis</i> NCTC 5188	37°C / 18 H / A	crescita, colonie verde-blu
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	37°C / 18 H / A	crescita inibita

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection; NCTC: National Type Culture Collection of the UK Health Protection Agency

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Drigalski Lactose Agar sono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con 7 ceppi target Gram negativi: *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *C. freundii* ATCC 8090, *A. calcoaceticus* ATCC 19606, *S. Enteritidis* NCTC 5188, *P. mirabilis* ATCC 10005 e *P. vulgaris* ATCC 9484. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h ore in aerobiosi si osservano le caratteristiche cromatiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano colori tipici e buone crescite, comparabili con il Lotto di Riferimento

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non-target Gram positivi: *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi la crescita dei ceppi non target risulta completamente inibita alla diluizione 10⁻¹.

13 - LIMITI DEL METODO

- Su questo terreno, si può osservare per alcuni ceppi di *Proteus* il fenomeno della sciamatura.
- Incubazioni protratte oltre le 24 ore possono indurre un viraggio all'alcalinità dei ceppi lattosio positivi. Non incubare oltre le 24 ore.
- 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 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno 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.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime 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 di sicurezza specifiche per i prodotti 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, in provetta o in fialone.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Sterilizzare tutti i rifiuti biologici. Smaltire il terreno inoculato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*
- 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.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo del terreno e della definizione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Dupeyron CM, Guillerman GA, Leluan GJ. Rapid diagnosis of gram negative urinary infections: identification and antimicrobial susceptibility testing in 24 hours. *J Clin Pathol* 198; 39:208-211.
2. Grohs P, Tillecovidin B, Caumont-Prim A, et al. Comparison of Five Media for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase by Use of the Wasp Instrument for Automated Specimen Processing. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2713-2716.
3. Vidal-Navarro L, Pfeiffer C, Bouziges N, Sotto A, Lavigne JP. Faecal Carriage of Multidrug-Resistant Gram-negative Bacilli During a Non-Outbreak Situation in a French University Hospital. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2455-8.





4. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of Carbapenemase Producers in Enterobacteriaceae by Use of a Novel Screening Medium. J Clin Microbiol 2012; 50: 2761–2766.
5. Gokul Yaratha, MD, Sarah Perloff, DO, Kinesh Changala, MBBS. Lactose vs non-lactose fermenting E. coli: Epidemiology, Clinical Outcomes, and Resistance. Open Forum Infect Dis 2017; V4 (Suppl 1)

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	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 6	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	02/2022
Revisione 7	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

