

ISTRUZIONI PER L'USO

HERELLEA AGAR

Terreno di coltura in polvere

 Herellea Agar: *A. calcoaceticus*
1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno per la coltivazione, l'isolamento e la differenziazione dei batteri Gram negativi non fermentanti e fermentanti. Particolarmente adatto per la differenziazione di *Acinetobacter* spp. (precedentemente *Herellea*) in campioni uretrali e vaginali.

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

Tryptone	15,00 g
Peptone di soia	5,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Lattosio	10,00 g
Maltosio	10,00 g
Sali biliari n.3	1,25 g
Porpora di bromocresolo	0,02 g
Agar	16,00 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Herellea Agar è stato formulato da Mandel, Wright e McKinnon¹ nel 1964 come terreno selettivo per migliorare l'isolamento degli organismi *Mima* ed *Herellea* nei campioni di pazienti con gonorrea, in presenza di un gran numero di cocchi Gram-positivi e bastoncini Gram negativi (di solito membri della famiglia *Enterobacteriaceae*) frequentemente riscontrati nelle secrezioni uretrali e vaginali.

Herellea Agar è usato per l'isolamento, la coltivazione e la differenziazione dei batteri Gram negativi fermentanti e non fermentanti il lattosio ed il maltosio ed è particolarmente raccomandato per la differenziazione di *Mima polymorpha* e *Herellea vaginicola* (includere insieme nelle specie *Acinetobacter*) da *Neisseria gonorrhoeae* in campioni uretrali e vaginali.²

I peptoni di caseina e di soia forniscono azoto, carbonio e altri nutrienti essenziali per la crescita batterica. L'inibizione dei batteri Gram-positivi e di *N.gonorrhoeae* è ottenuta con l'inclusione dei sali biliari n. 3. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il lattosio e il maltosio sono carboidrati fermentabili: i batteri fermentanti producono prodotti finali acidi che inducono il viraggio dell'indicatore di pH (porpora di bromocresolo) al giallo. *Acinetobacter* spp. non fermentano i due carboidrati e crescono con colonie color lavanda, lo stesso colore del terreno. Le colonie dei batteri fermentanti i due zuccheri appaiono gialle, circondate da una zona gialla nel terreno.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 62 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50°C e trasferire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, viola chiaro
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	terreno limpido di colore viola-lavanda
pH finale a 25 °C	6,8 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Herellea Agar	Terreno di coltura in polvere	4015432	500 g (8,1 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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

8 - CAMPIONI

Possono essere utilizzati campioni clinici quali i secreti vaginali ed uretrali. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare 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 di origine clinica 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 un'area ristretta in prossimità del bordo piastra, quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa

Incubare le piastre capovolte 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.

Su piastre di Herellea Agar, i microrganismi coltivano con le seguenti caratteristiche:

Acinetobacter spp. (lattosio/maltosio non fermentanti): Colonie color lavanda, a volte con centro leggermente più scuro
Enterobacteriaceae (lattosio/maltosio fermentanti): Colonie gialle con alone giallo

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.³

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>A.calcoaceticus</i> ATCC 19606	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie color lavanda
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie gialle con alone giallo
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24H / A	inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

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

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con i seguenti ceppi target: *A.calcoaceticus* ATCC 19606, due *A.baumannii*, d'isolamento clinico. Le colonie dei tre ceppi appaiono di color lavanda; sono anche valutate le cariche microbiche di questi ceppi e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi alle specifiche.

La specificità del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 35-37°C per 18-24 ore, con *E.coli* ATCC 25922 e *S.Typhimurium* ATCC 14028 e *P.aeruginosa* ATCC 14207: le colonie di *E.coli* e di *S.Typhimurium* appaiono gialle con alone giallo, le colonie di *P.aeruginosa* sono grigio verde con il pigmento che diffonde nel terreno; sono anche valutate le cariche microbiche di questi ceppi e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi alle specifiche.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non-target: *L.acidophilus* d'isolamento clinico, *B.subtilis* ATCC 6633, *E.faecalis* ATCC 19433, *S.aureus* ATCC 25923: la crescita di questi ceppi è totalmente inibita.

13 - LIMITI DEL METODO

- *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. non sono inibiti e, non producendo acidi dal lattosio e dal maltosio, coltivano con colonie incolori (*Proteus*) o grigio-verde (*Pseudomonas*)
- 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.

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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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 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 i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- 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. 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 produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/fiaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Mandel AD, Wright K, McKinnon JM. Selective medium for isolation of Mima and Herellea organisms. J Bacteriol 1964; 88:1524
2. Ronald M. Atlas, James W. Snyder. Handbook of Media for Clinical and Public Health Microbiology. CRC Press, 2014
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

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	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 5	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	03/2022
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

