

ANTIBIOTIC MEDIA

ANTIBIOTIC SEED AGAR A1 POLYMYXIN BASE AGAR A9 POLYMYXIN SEED AGAR A10 NEOMYCIN ASSAY AGAR A11 Terreni di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreni di coltura per il test di sensibilità agli antibiotici mediante diffusione in agar.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA*

TABELLA 1

Terreno	Antibiotic Seed Agar A1	Neomycin Assay Agar A11	Polymyxin Base Agar A9	Polymyxin Seed Agar A10
REF	4010752	4017752	4019202	4019252
Peptone	6,0	6,0		
Tryptone	4,0	4,0	17,0	17,0
Estratto di lievito	3,0	3,0		
Estratto di carne	1,5	1,5		
Peptone di soia			3,0	3,0
Glucosio	1,0	1,0	2,5	2,5
Sodio cloruro			5,0	5,0
Potassio fosfato bibasico			2,5	2,5
Agar	15,0	15,0	20,0	12,0
Quantità richiesta (g/L)	30,5	30,5	50,0	42,0
Tween 80 (da aggiungere alla base)				10

* La formulazione può essere compensata e/o corretta per soddisfare le prestazioni alle specifiche.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Gli Antibiotic media sono preparati con formulazioni conformi alla pubblicazione FDA 21 CFR ¹. Sono identificati numericamente con i nomi assegnati da Grove e Randall ² e destinati al dosaggio microbiologico degli antibiotici e alla determinazione quantitativa degli antibiotici in preparazioni farmaceutiche, negli alimenti, nei preparati per mangimi e altri materiali. Il metodo più comune per il dosaggio microbiologico degli antibiotici è il test di diffusione in agar eseguito mediante test del cilindro, del pozzetto del disco di carta bibula. Il mezzo di coltura viene inoculato con il ceppo di prova e distribuito in piastre. In base alla tecnica impiegata, cilindro, pozzetto o disco di carta, si distribuiscono quantità definite dell'antibiotico da dosare e di un antibiotico standard. Durante l'incubazione, attorno al punto di inoculo si sviluppa un alone di inibizione della crescita microbica, il cui diametro è una misura dell'attività dell'antibiotico testato, da confrontare con i diametri di inibizione degli aloni ottenuti con soluzioni standard dello stesso antibiotico.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere la quantità di terreno richiesta (vedere la Tabella 1) in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere il ceppo microbico di prova. Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili. Polymyxin Seed Agar A10 richiede l'aggiunta di Tween 80 prima dell'autoclavatura.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

TABELLA 2

Terreno	Antibiotic Seed Agar A1	Neomycin Assay Agar A11	Polymyxin Base Agar A9	Polymyxin Seed Agar A10
REF	4010752	4017752	4019202	4019252
Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige			
Aspetto del terreno in piastra	Limpido, giallo	Limpido, giallo	Limpido, giallo	Limpido, giallo
pH (20-25 °C)	6,5 ± 0.1	7,8 ± 0.2	7,3 ± 0.2	7,3 ± 0.2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Antibiotic Seed Agar A1	Terreno di coltura in polvere	4010752	500 g (16,4 L)
Neomycin Assay Agar A11	Terreno di coltura in polvere	4017752	500 g (16,4 L)
Polymyxin Base Agar A9	Terreno di coltura in polvere	4019202	500 g (10 L)
Polymyxin Seed Agar A10	Terreno di coltura in polvere	4019252	500 g (11,9 L)

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse sterili e tamponi, termostato e altra strumentazione richiesta, beute Erlenmeyer, piastre di Petri sterili, ceppi batterici, cilindri di acciaio e di porcellana, dischi di carta, reagenti e terreni accessori.



**8 – CAMPIONI**

Preparazioni farmaceutiche, alimenti, mangimi e altri materiali.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI**Preparazione della sospensione microbica¹**

Mantenere i microrganismi in provette a becco di clarino, contenenti 10 mL di terreno appropriato (generalmente Antibiotic Seed Agar A1). Incubare le provette a 32°C – 35°C per 24 ore. Utilizzando 3 mL di soluzione salina sterile, rimuovere la crescita dal becco di clarino e trasferirla su una grande superficie di agar, come una bottiglia Roux, contenente 250 mL del terreno appropriato. Distribuire la sospensione di microrganismi su tutta la superficie della bottiglia di Roux con l'ausilio di biglie di vetro sterili. Incubare la bottiglia Roux a 32°C–35°C. Rimuovere la crescita risultante dalla superficie dell'agar con 50 mL di soluzione salina sterile. Determinare il fattore di diluizione che darà una trasmissione della luce del 25% a una lunghezza d'onda di 580 millimicron utilizzando un colorimetro fotoelettrico adatto e una provetta di 13 mm di diametro come cella di assorbimento. Potrebbe essere necessario aggiustare la sospensione. Determinare la quantità di sospensione da aggiungere a ogni 100 mL di agar mediante l'uso di piastre di prova. Conservare la sospensione dell'organismo di prova in frigorifero.

Questo schema di lavoro generale è valido per tutti i ceppi di prova, con queste eccezioni:

- 1) Per *Bacillus subtilis* centrifugare la crescita della bottiglia di Roux, decantare il surnatante, raccogliere i microrganismi in 50-70 mL di soluzione fisiologica e riscaldare la sospensione risultante a 70°C per 30 minuti.
- 2) Per *Bacillus cereus* var. *mycoides*, utilizzare il metodo generale con le modifiche descritte per *Bacillus subtilis*, ma riscaldare la sospensione microbica prima della centrifugazione e lavare la sospensione di spore tre volte con 25-30 mL di acqua distillata sterile. Dopo l'ultimo lavaggio, risospendere le spore in 50-70 mL di acqua distillata sterile.
- 3) Per il *Microsporium gypseum* incubare una beuta Erlenmeyer contenente 200 mL di Sabouraud Broth con aggiunta di glucosio al 20%, inoculato con il microrganismo, per 6-8 settimane a 25°C. Verificare il grado di sporificazione e quando supera l'80%, raccogliere le spore dallo strato micellare con una spatola: le spore sono sulla superficie del materiale che galleggia nel brodo. Sospendere le spore raccolte in 50 mL di soluzione fisiologica sterile e conservare in frigorifero.
- 4) Conservare *Enterococcus faecalis* in 10 mL di brodo antibiotico A3. Per eseguire il test, preparare una nuova sottocoltura, trasferendo un'aliquota delle colture stock in 100 mL di brodo antibiotico A3 e incubare 16-18 ore a 37°C.
- 5) Per *Saccharomyces cerevisiae* incubare il becco di clarino di Antibiotic Seed Agar A1 a 30°C per 24 ore e la bottiglia di Roux a 30°C per 48 ore. Le sospensioni microbiche preparate come descritto possono essere utilizzate senza ulteriore diluizione per inoculare il mezzo di dosaggio turbidimetrico e di diffusione.

Saggio microbiologico di diffusione in agar

L'attività degli antibiotici è stimata confrontando l'inibizione della crescita di un microrganismo sensibile prodotta da 5 dosi di sostanza di riferimento e 1 dose di antibiotico da esaminare.³

Preparare il terreno idoneo inoculato con una quantità nota di una sospensione del microrganismo di prova sensibile all'antibiotico da esaminare.

Mescolare il terreno e l'inoculo e distribuire in piastre Petri una quantità tale da formare uno strato di 2-5 mm di spessore. In alternativa, il terreno può essere costituito da 2 strati, essendo inoculato solo lo strato superiore. Per ogni piastra Petri, possono essere generalmente adatti 21 mL di strato di base e 4 mL di strato di seminato.

Preparare le soluzioni della sostanza di riferimento e dell'antibiotico da esaminare a concentrazioni note.

Pipettare le soluzioni antibiotiche nei cilindri o nei fori praticati nell'agar o su dischi di carta con un diametro di 9 mm posti sulla superficie del terreno di coltura.

Incubare le piastre inoculate per 16-18 ore alla temperatura di incubazione appropriata per ciascun antibiotico.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE

Dopo l'incubazione, misurare i diametri degli aloni di inibizione utilizzando un dispositivo di misurazione appropriato come un righello millimetrico, un calibro o un proiettore ottico. Tracciare una curva di taratura utilizzando i valori delle soluzioni standard e leggere le attività delle soluzioni da esaminare. Fare riferimento alle procedure appropriate per la lettura e l'interpretazione dei risultati.^{1,3}

11 – CONTROLLO DI 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 responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi inoculati per inclusione, utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T / ATM	RISULTATI ATTESI
Antibiotic Seed Agar A1		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	35-37°C/18-24 H/A	buona crescita
Neomycin Assay Agar A11		
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	35-37°C/24-48 H/A	buona crescita
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	35-37°C/24-48 H/A	buona crescita
Polymyxin Base Agar A9, Polymyxin Seed Agar A10		
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	35-37°C/40-48 H/A	buona crescita

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

12 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è 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 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.





- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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 qui descritto 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.
- 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.

13 – 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 (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

14 - BIBLIOGRAFIA

1. Food and Drug Administration. 21 CFR, Part 436 – Tests and Methods of Assay of Antibiotic and Antibiotic Containing Drugs. Subpart D—Microbiological Assay Methods. April 1, 1996
2. Grove and Randall. 1955. Assay methods of antibiotics. Medical Encyclopaedia, Inc. New York, N.Y.
3. USP 31 <81> Antibiotic, Microbial Assay

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 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	09/2022

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

