

**ISTRUZIONI PER L'USO****ROGOSA BIOS AGAR**
Terreno di coltura in polvere*L.rhamnosus* su Rogosa Bios Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno di coltura per l'isolamento selettivo ed il conteggio dei lattobacilli da campioni clinici ed alimenti.

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

Peptozimatic	2.00 g
Triptone	4.00 g
Estratto di lievito	9.00 g
Glucosio	10.00 g
Arabinosio	5.00 g
Saccarosio	5.00 g
Sodio acetato	15.00 g
Ammonio citrato	2.00 g
Potassio fosfato monobasico	6.00 g
Magnesio solfato	0.57 g
Manganese solfato	0.12 g
Ferro solfato	0.03 g
Agar	15.00 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I lattobacilli sono batteri Gram-positivi a forma di bastoncino, non sporigeni, anaerobi aerotolleranti o microaerofili. I lattobacilli sono membri comuni del microbiota umano, presenti in numerosi siti del corpo, come la cavità orale, il tratto gastrointestinale ed il sistema genitale femminile, tuttavia, anche se raramente, possono agire come patogeni opportunistici sia nei bambini che negli adulti.¹

I lattobacilli sono associati alla carie dentale avanzata dove sono considerati come colonizzatori secondari ma probabilmente svolgono un ruolo nell'esacerbare lesioni esistenti ed inoltre sono stati associati ad una moltitudine di infezioni tra cui batteriemia, endocardite, peritonite, corioamnionite, meningite e ascessi intra-addominali.¹ La riduzione dei lattobacilli nel microbiota vaginale e l'instaurarsi di una maggiore diversità batterica, sono caratteristiche della vaginosi batterica.¹

Rogosa Bios Agar é preparato secondo una modifica della formula proposta da Rogosa, Mitchell e Wiseman^{2,3} ed è impiegato per l'isolamento ed il conteggio dei lattobacilli in campioni clinici ed alimenti.^{1,4,5}

Il terreno contiene due peptoni ed estratto di lievito come fonti di azoto, carbonio e vitamine, necessari per la crescita microbica. Glucosio, arabinosio e saccarosio forniscono carbonio e sono fonti di energia. Tween 80 agisce come tensioattivo e fornisce acidi grassi necessari per il metabolismo dei lattobacilli. L'ammonio citrato ed il sodio acetato inibiscono la crescita di streptococchi, muffe e altri organismi della flora microbica orale e limitano la sciamatura di *Proteus*. Il potassio diidrogeno fosfato è un agente tamponante, il magnesio solfato, il ferro solfato ed il manganese solfato sono fonti di ioni inorganici per la crescita ottimale dei lattobacilli. L'acido acetico riduce il pH del mezzo a valori acidi.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 73,7 g in 1000 L di acqua purificata fredda. Aggiungere 1 mL di Tween 80 e 1,32 mL di acido acetico glaciale. Portare a ebollizione, far bollire per 2-3 minuti e distribuire in piastre Petri sterili. Il terreno non richiede la sterilizzazione in autoclave.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, giallastra

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

giallo, limpido

pH finale a 20-25 °C

5,4 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rogosa Bios Agar	Terreno in polvere	4019852	500 g (6,8 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Bagnomaria, anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse e tamponi da microbiologia, giare e materiale per la generazione di un'atmosfera di incubazione con CO₂, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Le piastre preparate con Rogosa Bios Agar possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici come feci, saliva, campioni vaginali.^{4,5} 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. Consultare la bibliografia per ulteriori informazioni.¹

Rogosa Bios Agar può essere utilizzato per l'esame degli alimenti: per informazioni dettagliate, consultare i metodi standard appropriati.⁶ Il terreno non è adatto per l'isolamento dei lattobacilli dal latte.⁴

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. Inoculare e strisciare il campione con un'ansa sui quattro quadranti della piastra per ottenere colonie ben isolate, assicurandosi che le sezioni 1 e 4 non si sovrappongano. 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. Per valutazioni quantitative utilizzare tecniche di inoculo appropriate. Incubare per 3 giorni a 35°C o per 5 giorni a 30°C.² I lattobacilli preferiscono un'atmosfera microaerofila, pertanto alcuni autori raccomandano un'incubazione in un'atmosfera arricchita di CO₂ al 5-10% o in condizioni anaerobiche.^{2,3,4}

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

I lattobacilli si presentano con colonie grandi (2-3 mm di diametro), biancastre, lisce e circolari.

Anche altri batteri lattici possono crescere su questo terreno e produrre colonie simili. La maggior parte degli altri microrganismi sono inibiti sebbene enterococchi e pediococchi possano mostrare una crescita ritardata. Sia gli enterococchi che i pediococchi producono colonie molto piccole con un diametro compreso tra 0,5 e 1,0 mm.

11 - 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 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>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	35-37°C / 44-48 H / CO ₂	crescita
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 44-48 H / CO ₂	inibito

CO₂: atmosfera con 5-10% di CO₂; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo dei lotti di produzione di terreno in polvere Rogosa Bios Agar è valutato per la produttività e la selettività.

La produttività è valutata con metodo quantitativo e con tecnica ecometrica semiquantitativa, inoculando le piastre con i ceppi-target *L. plantarum* ATCC 8014, *L. rhamnosus* ATCC 7469, *L. gasseri* ATCC 19992, *L. acidophilus* ATCC 314. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48°C, in atmosfera con 5-10% di CO₂, i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie biancastre.

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 di *S. lactis* ATCC 11454, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, e *C. albicans* ATCC 10231. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48°C, in atmosfera con 5-10% di CO₂, la crescita di *S. lactis*, *E. faecalis* ed *E. coli* è totalmente inibita, mentre *C. albicans* è parzialmente inibita.

13 - LIMITI DEL METODO

- In generale, le specie di *Lactobacillus* coltivano selettivamente su terreni con pH acido come Rogosa agar, sebbene alcuni ceppi più esigenti potrebbero non crescere su questi terreni.¹
- Si consiglia di inoculare, insieme a Rogosa Bios Agar, anche terreni convenzionali al sangue.¹
- Il terreno non è consigliato per il mantenimento dei lattobacilli; trasferire le colonie per ulteriori test il prima possibile.⁴
- Il contenuto salino della formulazione rende il terreno non adatto per l'isolamento dei lattobacilli dal latte: *L. lactis*, *L. bulgaricus* e *L. helveticus*.⁴
- Su questo terreno possono crescere altri microrganismi come enterococchi, pediococchi e *Leuconostoc*.
- 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 +2°C /+8°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/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Butler-Wu SM, She RC. *Actinomyces, Lactobacillus, Cutibacterium* and other non-spore-forming Gram-positive rods. In Carrol KC, Pfaller MA *et al.* editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
2. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli J Bact 1951; 62:132
3. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. J Dent Res 1951; 30(5):682
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. Atlas R. Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition. CRC Press, 1997.
6. Hall, Ledenbach and Flowers. In Downes and Ito (ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2001.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF	 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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2022
Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

