

**1 ISTRUZIONI PER L'USO****VCNT ANTIMICROBIC SUPPLEMENT****Supplemento selettivo liofilizzato****1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Miscela di sostanze antimicrobiche da aggiungere a terreni di coltura per l'isolamento selettivo di *Neisseria gonorrhoeae* da campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA ***CONTENUTO DEL FLACONE PER 500 ML DI TERRENO**

Vancomicina	1,5 mg
Colistina	3,75 mg
Nistatina	6250 UI
Trimetoprim	2.5 mg

*La composizione può essere compensata e/o corretta per adeguare le prestazioni del prodotto alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nel 1964 Thayer e Martin¹ formularono un terreno selettivo per la coltivazione di *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, incorporando nel GC Agar emoglobina, supplemento di lievito B, polimixina B e ristocetina. Thayer e Martin migliorarono nel 1966² la formulazione, sostituendo gli antibiotici originali con vancomicina, colistina e nistatina (VCN). Nel 1970 Martin e Lester³ modificarono il nuovo terreno Thayer-Martin, aumentando il contenuto di agar e glucosio e incorporando un antibiotico aggiuntivo, il trimetoprim lattato; questo terreno migliorato fu chiamato Modified Thayer-Martin (MTM) Medium.

VCNT Antimicrobial Supplement è una miscela liofilizzata di antimicrobici da utilizzare come supplemento del terreno GC Medium Base per l'isolamento selettivo di *Neisseria gonorrhoeae*.

La vancomicina inibisce i contaminanti Gram-positivi, la colistina inibisce i batteri Gram-negativi, comprese le specie di *Pseudomonas* e quasi tutti le neisserie saprofiti, la nistatina è un agente antimicotico, il trimetoprim sopprime la sciamatura dei protei.

4- METODO DI RICOSTITUZIONE E DI PREPARAZIONE DEL TERRENO

Ricostituire il contenuto di una fiala di VCNT Antimicrobial Supplement con 5 ml di acqua purificata sterile, usando le precauzioni dell'asepsi. Utilizzare il supplemento ricostituito per la preparazione del terreno Modified Thayer-Martin (MTM) Medium come qui sotto descritto.

Sospendere 19 g di GC Medium Base (REF 401520) in 500 mL di acqua purificata fredda; portare ad ebollizione mescolando continuamente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere asepticamente il 5% di sangue defibrinato di montone e scaldare a bagnomaria a 80°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere:

- il contenuto di un flacone di Biovitex ricostituito con 5 mL di Restoring Fluid (ref. n° 4240009).
- il contenuto di un flacone di VCNT Antimicrobial Supplement ricostituito come descritto sopra.

Invece del sangue di montone, GC Medium Base può essere addizionato con una soluzione sterile di emoglobina bovina: 5 g di emoglobina bovina in 250 mL di acqua sterilizzata in autoclave + 250 mL di GC Medium Base a doppia concentrazione autoclavato.

Mescolare bene e distribuire in piastre sterili.

pH finale del terreno completo: 7,2 ± 0,2.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto del prodotto liofilo	pastiglia gialla, bassa, compatta
Aspetto del prodotto ricostituito	soluzione di colore giallo, torbida

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
VCNT Antimicrobial Supplement	Supplemento per terreni di coltura	4240008	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno completo. Confezionamento secondario: scatola di cartone

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

GC Medium Base (REF 401520) o altro terreno adatto, emoglobina bovina o sangue defibrinato di montone, arricchimento Biovitex (REF 4240009), autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio. Beute, piastre sterili, anse e tamponi sterili da microbiologia, materiali per la generazione di una atmosfera di incubazione controllata con CO₂ o incubatore a CO₂ con umidificatore, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

8 – CAMPIONI

Le piastre di Modified Thayer-Martin Medium preparate come sopra descritto, possono essere inoculate direttamente con campioni clinici umani raccolti da siti contaminati da flora mista, batterica e/o fungina (tratto urogenitale, vie aeree superiori, pus ed essudati).⁴⁻⁶

Il terreno non è adatto per l'isolamento di *Neisseria* da siti supposti sterili quali il liquor, il tampone congiuntivale, le biopsie cutanee, il liquido articolare.⁷ Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici. Consultare la letteratura appropriata poiché *Neisseria* è molto sensibile alle procedure di raccolta e di conservazione.⁴

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. La superficie dell'agar deve essere liscia ed umida, ma senza una eccessiva quantità di acqua. Seminare il campione il più presto possibile dopo che è stato ricevuto in laboratorio per evitare la perdita di vitalità dei gonococchi e la crescita eccessiva di contaminanti.

Inoculare pesantemente con il materiale ruotando il tampone su un quadrante della piastra, quindi strisciare sugli altri tre quadranti per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate, assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo.





In alternativa eseguire una semina a forma di una larga "Z" con il tampone di raccolta del campione, per scaricare il più possibile il materiale quindi, con un'ansa sterile, strisciare incrociando la "Z".

Incubare le piastre inoculate a 35-36,5°C in atmosfera umida con il 3-7% di CO₂. Esaminare le piastre dopo 24 e 48 ore e, se necessario dopo 72 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le colonie di *N.gonorrhoeae* sono di dimensioni variabili, di solito piccole (0,5-2 mm), moderatamente convesse, sollevate, granulari, luccicanti, umide, con margini interi o lobati, di solito da bianco grigiastro a traslucido; quasi tutti i ceppi diventano mucoidi dopo 48 ore.

Sulle colonie sospette eseguire la colorazione di Gram per confermare la presenza di diplococchi uniformi Gram negativi ed il test dell'ossidasi (+).

11 - CONTROLLO DI 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.⁸

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
Modified Thayer-Martin Medium		
<i>N.gonorrhoeae</i> ATCC 43069	35-36,5°C / 24-48H / CO ₂	buona crescita,
<i>N.sicca</i> ATCC 9913	35-36,5°C / 24-48H / CO ₂	crescita parzialmente inibita
<i>P.mirabilis</i> ATCC 43071	35-36,5°C / 24-48H / CO ₂	crescita inibita
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-36,5°C / 24-48H / CO ₂	crescita inibita
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	35-36,5°C / 24-48H / CO ₂	crescita inibita
<i>C.albicans</i> ATCC 60193	35-36,5°C / 24-48H / CO ₂	crescita parzialmente inibita

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 VCNT Antimicrobial Supplement sono testati per la produttività e la selettività con piastre di Modified Thayer-Martin (MTM) Medium. La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *N.gonorrhoeae* ATCC 43069, *N.gonorrhoeae* ATCC 19424. Dopo incubazione a 35-36,5°C per 18-24 ore in atmosfera al 5-10% di CO₂ si osserva l'entità delle crescite. I due ceppi mostrano buone crescite con colonie a morfologia tipica.

La selettività è valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non-target: *N.sicca* ATCC 9913, *S.epidermidis* ATCC 12228, *E.coli* ATCC 25922, *P.mirabilis* ATCC 43071, *P.rettgeri* ATCC 39944, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 19433 e *C.albicans* ATCC 60193. Dopo incubazione a 35-36,5°C per 24-48 ore, con 3-7% di CO₂, la crescita dei ceppi non target risulta inibita.

13 - LIMITI DEL METODO

- Sono stati segnalati dal 3% al 10% di ceppi sensibili alla vancomicina appartenenti ad alcuni auxotipi di *N.gonorrhoeae*, che non sviluppano crescita sul terreno.^{9,10} Alcuni gonococchi sono anche sensibili al trimetoprim.¹¹
- Per l'isolamento delle neisserie patogene, al fine di evitare la perdita dei ceppi sensibili alla vancomicina e/o al trimetoprim, si raccomanda di utilizzare, abbinato al Modified Thayer-Martin Medium, un terreno non selettivo, quale l'agar cioccolato arricchito.⁷
- Modified Thayer-Martin Medium non è indicato per l'isolamento di *Neisseria* spp. da siti supposti sterili.⁷
- Per la crescita di *N.gonorrhoeae* è necessario che la superficie delle piastre sia umida; se appare secca, umidificare con alcune gocce di acqua distillata sterile. Posizionare una garza umida o salviette di carta nel contenitore di incubazione in CO₂ o utilizzare un termostato con umidificatore.
- Su Modified Thayer-Martin Medium *N.gonorrhoeae* cresce con colonie più piccole e più granulari rispetto all' agar cioccolato non selettivo.
- Su questo terreno possono crescere microrganismi saprofiti, resistenti agli antimicrobici presenti. Ad esempio *N. lactamica* può crescere con colonie più piccole e meno umide dei gonococchi, occasionalmente con una tinta giallastra.⁷
- I gonococchi sono tra i batteri Gram negativi più fragili. Inoculare qualsiasi campione sospetto di contenere *Neisseria* sul terreno di isolamento primario immediatamente al momento del prelievo per evitare qualsiasi perdita di vitalità e/o crescita eccessiva di contaminanti; se ciò non fosse possibile, i tamponi di *N.gonorrhoeae* devono essere mantenuti a 4-6°C per non più di 3 ore.⁷
- La temperatura dell'incubatore deve essere impostata a 35-36,5°C¹² poiché molti ceppi di *N.gonorrhoeae* non crescono bene a 37°C.^{7,12}
- Esaminare le piastre dopo 24 ore di incubazione. A 48 ore la morfologia Gram può presentare forme atipiche.
- Molti protocolli standard¹³⁻¹⁵ descrivono l'impiego del terreno Modified Thayer-Martin Medium per individuare i portatori di meningococco, con tamponi orofaringei e rinofaringei. Questa applicazione non è prevista dalla destinazione d'uso del terreno GC Medium Base addizionato di Biovitex e VCNT Antimicrobial Supplement. L'utente finale deve validare questa applicazione prima di utilizzare di routine il terreno per la determinazione di *N.meningitidis* nei campioni clinici umani.
- Utilizzare tamponi di dacron o di alginato di calcio per la raccolta dei campioni, evitare i tamponi di cotone poiché contengono acidi grassi che sono inibitori di *N.gonorrhoeae*.⁷
- Metodi di raccolta del campione, temperatura di incubazione, livello di CO₂, umidità e pH non corretti possono influenzare negativamente la crescita e la vitalità dei microrganismi.
- L'inattivazione o il deterioramento degli antibiotici nei terreni selettivi possono consentire la crescita di contaminanti.
- Si consiglia di misurare il pH dei terreni completi. GC Medium Base ha una capacità tamponante sufficiente, tuttavia a volte potrebbe essere necessario correggere il pH finale.
- Le colonie microbiche presenti sulle piastre, 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 supplemento VCNT ed i terreni di coltura con esso preparati sono da intendersi come ausili 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 supplemento 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 è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente; consultare la Scheda di Sicurezza prima dell'uso.
- VCNT Antimicrobic Supplement ed il terreno di base devono essere usati in associazione secondo le indicazioni sopra descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- VCNT Antimicrobic Supplement è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica per evitare lesioni.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il supplemento, i terreni di coltura e con gli agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione; smaltire il supplemento non utilizzato ed i terreni di coltura seminati con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare VCNT Antimicrobic Supplement come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano e 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

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; non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Esaminare il prodotto liofilo ed il prodotto ricostituito al momento dell'uso e scartare se vi fossero segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

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) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Thayer JD, Martin JE. A selective medium for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Pub. Health Rep. 1964; 79:49.
2. Thayer JD, Martin JE. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Pub. Health Rep. 1966; 81:559-562.
3. Martin JE Jr, Lester A. Transgrow, a medium for transport and growth of *N. gonorrhoeae* and *N. Meningitidis*. HSMHA Health Service Rep. 1971; 86:30
4. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
5. Public Health England: Standards for microbiology investigations (UK SMI)- Bacteriology : UK SMI B2:2017, UK SMI B9:2015, UK SMI B14:2016; UK SMI B28:2017; B51:2014
6. Elias J, Frosh M, Vogel U. Neisseria. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.635.
7. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
8. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004 Talbot V. et al. Vancomycin sensitive penicillinase producing *Neisseria gonorrhoea*. Br.J Ven Dis. 1983; 59:277
9. Talbot V. et al. Vancomycin sensitive penicillinase producing *Neisseria gonorrhoea*. Br.J Ven Dis. 1983; 59:277
10. Mirret S, Reller B, Knapp JS. *Neisseria gonorrhoeae* Strains inhibited by vancomycin in selective media and correlation with auxotype. J Clin Microbiol 1981; 14: 94
11. Lai-King Ng, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005; 16(1): 15-25.
12. CDC: Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Screening Tests To Detect Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae*. Infections Recommendations and Reports. October 18, 2002 / Vol. 51 / No. RR-15
13. CDC Lab Manual, meningitides; Annex: Preparation of Media and Reagents, 2016
14. Elias J, Frosh M, Vogel U. Neisseria. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.635.
15. Public Health England: Standards for microbiology investigations (UK SMI)- Bacteriology: UK SMI B2:2017, UK SMI B9:2015, UK SMI B14:2016; UK SMI B28:2017; B51:2014

VCNT ANTIMICROBIC SUPPLEMENT REF 4240008

SDS

Regolamento (UE) 2020/878

Classificazione

Il prodotto è classificato pericoloso. Richiede una scheda dati di sicurezza conforme alle disposizioni del Regolamento (UE) 2020/878.

Classificazione e indicazioni di pericolo:

Tossicità acuta, categoria 4	H302	Nocivo se ingerito.
Sensibilizzazione cutanea, categoria 1	H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.

Etichettatura

Pittogrammi di pericolo:





Avvertenze: **Attenzione**
 Indicazioni di pericolo:
 H302 **Nocivo se ingerito.**
 H317 **Può provocare una reazione allergica cutanea.**
 Consigli di prudenza:
 P280 **Indossare guanti protettivi.**
 P261 **Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.**
 P333+P313 **In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.**
 P264 **Lavare accuratamente . . . dopo l'uso.**
 P362+P364 **Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.**
 Contiene: **VANCOMICINA HCL, COLISTINA**

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	12/2021
Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

