

ISTRUZIONI PER L'USO

YERSINIA SELECTIVE SUPPLEMENT
Supplemento selettivo liofilizzato.**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Miscela di sostanze antimicrobiche da aggiungere al terreno CIN Agar Base per l'isolamento e la caratterizzazione di *Yersinia enterocolitica* da campioni clinici e da altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE**CONTENUTO DEL FLACONE (PER 500 ML DI TERRENO)**

Cefsulodina	7,50 mg
Novobiocina	1,25 mg

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Yersinia Selective Supplement è una miscela liofilizzata di antimicrobici da utilizzare come supplemento al terreno CIN Agar Base per l'isolamento e la caratterizzazione di *Y. enterocolitica*.

Il terreno completo Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar, originariamente sviluppato nel 1979 da Schiemann,¹ è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la caratterizzazione di *Y. enterocolitica* da campioni clinici^{2,3} e non clinici^{4,5}. Il terreno è raccomandato da ISO 10273⁴ e da FDA-BAM⁵ per la determinazione di *Y. enterocolitica* negli alimenti.

I batteri Gram-positivi e alcuni Gram-negativi (es. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*) sono inibiti dagli agenti selettivi presenti nel terreno di base (sodio desossicolato, cristalvioletto, irgasan) e nel supplemento liofilizzato (cefsulodina e novobiocina).

4 - METODO DI RICOSTITUZIONE E DI PREPARAZIONE DEL TERRENO

Sciogliere il contenuto di una fiala di Yersinia Selective Supplement con 5 mL di acqua purificata sterile.

Con le precauzioni dell'asepsi, aggiungere a 500 mL di CIN Agar Agar Base (REF 401302) sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti e raffreddato a 47-50°C. Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto del liofilizzato	pastiglia bassa, compatta, bianca
Aspetto della soluzione	limpida, incolore

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Yersinia Selective Supplement	Supplemento liofilizzato	4240011	10 fiale, ciascuna per 500 mL di terreno

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

CIN Agar Agar Base (REF 401302), 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

Il terreno completo è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici come feci e tampone rettale^{2,3} e campioni non clinici come alimenti, mangimi e campioni della filiera alimentare^{4,5}. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni. Quando possibile, raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Per la raccolta dei campioni non di origine clinica fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.^{4,5}

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.

Campioni clinici

Inoculare 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 un'area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa. Le feci possono essere diluite 1: 4 in soluzione salina sterile o acqua peptonata allo 0,1%. È stato dimostrato che la diluizione riduce significativamente la quantità di flora contaminante senza compromettere l'isolamento degli agenti patogeni presenti in basso numero.³

Incubare in aerobiosi a 28-30 ° C per 24-48 ore.³

Campioni della catena alimentare⁴

La procedura generale prevede:

- Semina diretta della sospensione del campione preparata in brodo di PSB * su piastra di CIN agar e incubazione a 30°C ± 1°C per 24 h ± 2 ore, oppure
- Arricchimento nel brodo PSB e nel brodo ITC ** con incubazione a 25°C ± 1°C per 44 ± 4 ore, seguito da trattamento alcalino delle colture (0,5 mL di coltura + 4,5 mL KOH 0,5 % in soluzione fisiologica per 20 s ± 5 s) e la semina su CIN Agar (incubazione a 30°C ± 1°C per 24 h ± 2 h).
- L'utilizzatore può utilizzare un secondo terreno selettivo d'isolamento a sua scelta (ad es. Chromogenic Yersinia Agar) ***

Note

* Yersinia PSB Broth (REF 402270). ** Base di brodo Yersinia ITC REF 402265 aggiunta con supplemento di clorato di potassio (REF 4240065) e supplemento di ticarcillina irgasan antimicrobica (REF 4240060) *** Chromogenic Yersinia Agar Base (REF 408050) con supplemento Chromogenic Yersinia Supplement (REF 4240095)

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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





Y. enterocolitica fermenta il mannitolo e sviluppa colonie con centro rosso intenso con bordi irregolari o interi, circondati da una zona esterna che è solitamente traslucida (colonie ad "occhio di bue"). La dimensione della colonia, ed il rapporto tra il bordo e il diametro centrale variano considerevolmente tra i vari sierotipi.

I batteri mannitolo non fermentanti la cui crescita è consentita dal sistema selettivo del terreno, crescono con colonie incolori o giallo pallido. La crescita di microrganismi non appartenenti al genere *Yersinia* è marcatamente o completamente inibita.

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 qualità⁹

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	28-30°C / 18-24H / A	crescita, colonie con centro rosso e bordo trasparente
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	28-30°C / 44-48H / A	crescita inibita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	28-30°C / 44-48H / A	crescita inibita
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	28-30°C / 44-48H / A	crescita inibita

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 *Yersinia* Selective Supplement addizionali al terreno in polvere CIN Agar Base vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento lotti precedentemente approvati e considerati come Lotti di Riferimento.

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con il ceppo target *Y. enterocolitica* ATCC 23715. Le piastre del lotto in esame (TB) e del lotto di riferimento (RB), sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di sospensioni delle colonie del ceppo target. Dopo incubazione a 28-30°C per 18-24 ore in aerobiosi, vengono contate le colonie sviluppate sui due lotti e calcolato l'indice di produttività ($Pr = \text{UFC}_{\text{TB}} / \text{UFC}_{\text{RB}}$). Nel caso *Pr* sia superiore o uguale a 0,7 e le colonie mostrino il caratteristico aspetto "ad occhio di bue", i risultati sono giudicati conformi. La produttività è anche testata con metodo ecometrico con *Y. enterocolitica* DSM 13030 e *Y. enterocolitica* ATCC 9610.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato appropriate diluizioni di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target: *S. marcescens* ATCC 8100, *E. coli* ATCC 25922 8739, *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212. Dopo incubazione, *S. marcescens* risulta parzialmente inibita mentre gli altri ceppi non target sono completamente inibiti alla diluizione 10⁻¹.

13 - LIMITI DEL METODO

- In caso di crescita densa e compatta, la dimensione delle colonie di *Y. enterocolitica* può essere più piccola e il tipico centro rosso può essere poco chiaro o assente.⁴
- Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* crescono bene sul terreno ed essendo mannitolo fermentanti, sviluppano colonie del tutto simili a quelle di *Y. enterocolitica*.⁶
- Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* non sono inibiti dagli agenti selettivi del terreno; *Serratia* ed *Enterobacter* sviluppano colonie rilevate, mucoidi, con una diffusa pigmentazione rosa, anche se, occasionalmente possono essere confuse con le colonie di *Y. enterocolitica*. *Citrobacter* sviluppa le colonie più simili a quelle di *Yersinia* e non possono essere distinte solo con le caratteristiche morfologiche.⁶
- La maggior parte dei ceppi di *Y. pseudotuberculosis* è inibita dalla concentrazione di 15 mg/L di cefsulodina.⁷
- Alcuni ceppi di *Y. enterocolitica* serovar O3 non crescono su CIN Agar.⁷
- 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 ed il supplemento qui descritti sono 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 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.
- I supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il supplemento qui descritto ed il terreno di base devono essere usati in associazione secondo le indicazioni sopra riportate. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Il supplemento qui descritto 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 il supplemento qui descritto 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 della correttezza del ciclo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia (piastre/flaconi) e delle condizioni di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Schiemann D A. Synthesis of a selective agar medium for Yersinia enterocolitica. Can J Microbiol 1979; 25(11):1298-1304,
2. Petersen MJ, Gladney LM, Schriefer ME. Yersinia. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015
3. Public Health England. Investigations of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. UK Standards for Microbiology Investigations. 2014. B 30 Issue 8.1.
4. ISO 10273:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of pathogenic Yersinia enterocolitica
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 8: Yersinia enterocolitica. Rev 10/2017
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Fukushima H, Gomyoda M. Growth of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica Biotype 3B Serotype 03 Inhibited on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar. J Clin Microbiol 1986, 24:116-120

4240011 YERSINIA SELECTIVE SUPPLEMENT

SDS

Regolamento (UE) 2020/878

Miscela contenente sostanze pericolose: cefsulodina sodica e novobiocina**Classificazione**

Irritazione oculare, categoria 2

Irritazione cutanea, categoria 2

Sensibilizzazione respiratoria, categoria 1

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1

H319 Provoca grave irritazione oculare.

H315 Provoca irritazione cutanea.

H334 Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.

Etichettatura

Pittogramma



Avvertenza

Indicazioni di pericolo

H319

H315

H334

H317

Consigli di prudenza:

P261

P280

P342+P311

P304+P340

P333+P313

P337+P313

Attenzione

Provoca grave irritazione oculare.

Provoca irritazione cutanea.

Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

Può provocare una reazione allergica cutanea.

Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

Indossare guanti protettivi e proteggere gli occhi / il viso.

In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .

IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.

In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	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 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

