

ISTRUZIONI PER L'USO

CHOCOLATE AGAR ENRICHED

Piastre pronte all'uso


Neisseria gonorrhoeae
su Chocolate Agar Enriched

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale non selettivo per la coltivazione e l'isolamento di microrganismi esigenti da campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptocomplex	15 g
Amido di mais	1 g
Dipotassio idrogeno fosfato	4 g
Potassio diidrogeno fosfato	1 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	12 g
Sangue defibrinato di cavallo, scaldato a 80°C	50 mL
Acqua purificata	1000 mL
Biovitex Enrichment Supplement	
Nicotinamide adenin dinucleotide (NAD)	2.5 mg
Cocarbossilasi	1 mg
Acido p-aminobenzoico	0.13 mg
Tiamina	0.03 mg
Vitamina B12	0.1 mg
L-glutamina	100 mg
L-cistina	11 mg
L-cisteina HCl	259 mg
Adenina	10 mg
Guanina HCl	0.3 mg
Ferro nitrato.6H ₂ O	0.2 mg
Glucosio	1 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nel 1945, Johnston¹ descrisse un terreno di coltura che consentiva lo sviluppo di colonie di *N. gonorrhoeae* in 24 ore, invece delle tradizionali 48 ore. Questo terreno fu successivamente modificato da Carpenter e Morton² usando GC Medium Base con l'aggiunta di emoglobina e un concentrato di lievito (agar cioccolato). Il terreno fu ulteriormente migliorato sostituendo il concentrato di lievito con un supplemento chimicamente definito, formulato specificamente per facilitare la crescita dei gonococchi.³

Chocolate Agar Enriched è un terreno non selettivo per uso generale preparato con GC Medium Base, addizionato con sangue defibrinato di cavallo riscaldato e Biovitex, per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi nutrizionalmente esigenti da campioni clinici.^{4,5}

Peptocomplex fornisce carbonio, azoto ed oligoelementi per la crescita batterica, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico, i fosfati tamponano il terreno prevenendo modifiche del pH dovute alla produzione di ammine, l'amido di mais è incluso per assorbire i sottoprodotti tossici contenuti nel campione ed è una fonte di energia per la crescita batterica.⁴

Il sangue riscaldato di cavallo fornisce emina (fattore X) necessaria per la crescita degli emofili e per migliorare la crescita di *Neisseria*. Il terreno è addizionato con Biovitex che fornisce il fattore V (NAD) per la crescita di *Haemophilus* spp., vitamine, aminoacidi, coenzimi, glucosio, ioni ferro e altri fattori che stimolano e migliorano la crescita delle neisserie patogene.

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	marrone, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,2 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chocolate Agar Enriched	Piastre pronte all'uso	541521	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, 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.

7 - CAMPIONI

Le piastre di Chocolate Agar Enriched possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici umani raccolti da siti sterili e non. Consultare la bibliografia citata per i campioni da esaminare in rapporto a specifiche infezioni.⁶⁻⁸ Le piastre di Chocolate Agar Enriched non sono indicate per la semina diretta di campioni di sangue. 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.⁶

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. Inoculare con 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 una area ristretta in prossimità del bordo piastra, quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare a 35-37 °C in atmosfera al 5-10% di CO₂ ed osservare dopo 18-24, 48 ore.

L'utilizzatore è responsabile della scelta del tempo di incubazione, della temperatura e dell'atmosfera appropriata, a seconda del campione in esame, delle esigenze nutrizionali degli organismi da isolare e dei protocolli operativi locali applicabili. Consultare le procedure descritte in bibliografia per ulteriori informazioni.^{7,8}

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le colonie di *Haemophilus influenzae* hanno un diametro di circa 1-2 mm sono incolori, trasparenti, umide e tendono ad essere traslucide, con un caratteristico odore "di topo".

Le colonie di *N.gonorrhoeae* sono di diametro variabile (0,5 - 2 mm), moderatamente convesse, sollevate, finemente granulari, luccicanti, con margini interi o lobati.

Per altri microrganismi esigenti, fare riferimento alle procedure citate in bibliografia, per la lettura e l'interpretazione dei risultati.^{7,8}

10 - 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>H.influenzae</i> ATCC 10221	35-37°C / 18-24H / CO ₂	buona crescita
<i>N.gonorrhoeae</i> ATCC 43069	35-37°C / 18-24H / CO ₂	buona crescita

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Chocolate Agar Enriched sono testati per la produttività, valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *H.influenzae* ATCC 10221, *N.gonorrhoeae* ATCC 43069, *S.pneumoniae* ATCC 6305. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in atmosfera al 5-10% di CO₂ si osserva l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano buone crescite.

12 - LIMITI DEL METODO

- A volte, nel terreno può essere osservata la presenza di piccole particelle. Questo fenomeno non influisce sulle prestazioni del terreno.
- La crescita microbica su Chocolate Agar Enriched dipende dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo; è possibile che alcuni ceppi non siano in grado di crescere sul terreno.
- A seconda dei campioni analizzati e dei microrganismi da isolare, si consiglia di utilizzare anche altri terreni selettivi come Thayer Martin per l'isolamento del gonococco e agar cioccolato con bacitracina per l'isolamento di *H.influenzae*.
- 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 nel contenitore per l'incubazione in CO₂ o utilizzare un termostato con umidificatore.⁴
- 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 delle *N.gonorrhoeae*.⁴
- 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.⁴
- Se si sospetta la presenza nel campione di *N.gonorrhoeae*, la temperatura d'incubazione dovrebbe essere impostata a 35-36,5°C con 5% di CO₂, poiché molti ceppi di *N.gonorrhoeae* non cresceranno bene a 37°C e con il 10% di CO₂.^{4,9}
- La presenza di colonie su Chocolate Agar Enriched non è di per sé un'indicazione della presenza di microrganismi patogeni nel campione: l'utilizzatore deve differenziare potenziali agenti patogeni che richiedono l'antibiogramma e test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa per l'identificazione completa, da contaminanti, membri di microbiota normale del campione.
- 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.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra 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 non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso 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 tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione, smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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.

14 - 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. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Johnston J. Comparison of gonococcus cultures read at 24 and 48 hours. J Vener Dis Inform 1945; 26:239.
2. Carpenter CM, Morton HE. An improved medium for isolation of the gonococcus in 24 hours. Proc. N.Y. State Assoc. Public Health Labs 1947; 27:58-60.
3. Martin JE Jr, Billings TE, Hackney JF, Thayer JD. Primary isolation of N.gonorrhoeae with a new commercial medium. Public Health Rep. 1967; 82:361-363.
4. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
5. Atlas R, Snyder J. Media Reagents and Stains. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015. p.345.
6. 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.
7. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneve: World Health Organization.
8. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019.
9. 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

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	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

