

ISTRUZIONI PER L'USO

GN BROTH HAJNA

Provette pronte all'uso

 GN Broth Hajna; da sinistra: provetta non inoculata e crescita di *Shigella flexneri*
1 - DESTINAZIONE D'USO

 Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno di arricchimento selettivo per l'isolamento e la coltivazione di batteri patogeni enterici Gram-negativi (*Salmonella* e *Shigella*) da campioni clinici ed altri materiali..

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Triptosio	20,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Potassio fosfato bibasico	4,0 g
Potassio fosfato monobasico	1,5 g
Sodio citrato	5,0 g
Sodio desossicolato	0,5 g
Mannitolo	2,0 g
Glucosio	1,0 g
Acqua purificata	1000 mL

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 GN (Gram Negative) Broth è preparato secondo la formulazione ideata da Hajna nel 1955.¹ Il terreno è utilizzato per l'arricchimento dei batteri patogeni enterici Gram negativi (*Salmonella* e *Shigella*), in campioni di origine clinica, industriale e ambientale.²

 La presenza di due carboidrati fermentabili, con una concentrazione del mannitolo doppia rispetto a quella del glucosio, consente una limitazione della crescita dei protei e di *Pseudomonas* nei campioni in cui vi sia presenza dei patogeni enterici fermentanti il mannitolo, nelle prime sei ore di incubazione.² Il tampono fosfato previene una acidificazione eccessiva del terreno durante la crescita batterica; il sodio citrato ed il sodio desossicolato sono presenti nel terreno allo scopo di inibire la crescita dei batteri Gram positivi e per limitare la crescita di alcuni Gram negativi.

 Croft e Miller³ e Taylor e Schelhart⁴ hanno riportato che la semina su piastra preceduta da un arricchimento di 6-8 ore in GN Broth, confrontata con l'inoculo diretto dei tamponi rettali su piastra, aumenta la sensibilità dell'isolamento di *Salmonella* e *Shigella*, poiché queste infezioni possono essere causate da un basso numero di batteri. In un altro studio, Taylor e Schelhart⁵ hanno dimostrato che GN Broth è superiore ai terreni di arricchimento con sodio selenito per l'isolamento di *Shigella*. GN Broth è consigliato anche per l'esame microbiologico di alimenti⁶ ed acque⁷.

 Per l'isolamento di *Shigella* da campioni fecali, si consiglia l'arricchimento in GN Broth, seguito da una subcoltura su due diversi terreni selettivi: XLD Agar e un secondo terreno meno selettivo (ad esempio Mac Conkey Agar).⁸
4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

 Aspetto del terreno in provetta paglierino, limpido
 pH (20-25°C) 7,0 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
GN Broth Hajna	Provette pronte all'uso	551524	20 x 10 mL; provette di vetro 17x125 mm, con fondo piatto e tappo a vite. Confezionamento in scatola di cartone.

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

 GN Broth Hajna può essere inoculato direttamente con i campioni clinici quali feci e tampone rettale. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni. Consultare i riferimenti appropriati per le informazioni su campioni non clinici.^{6,7}
8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Per l'esame delle feci, inoculare le provette con 1 g di feci o 1 mL di sospensione fecale ottenuta sospendendo 1 g di feci in 1 mL di soluzione salina. I tamponi rettali possono essere inseriti direttamente nel brodo.

Incubare a 35 ± 2 ° C con i tappi allentati per 6-8 ore, ma se si osserva una crescita microbica già alla 6a ora, eseguire una subcoltura su piastre di terreno selettivo e differenziale come Mac Conkey Agar, XLD Agar, Hektoen Enteric Agar. Incubare nuovamente le provette e trasferire su piastra nuovamente dopo 18-24 ore.

 Consultare i riferimenti appropriati per le informazioni sul trattamento e la semina di altri campioni clinici^{8,9} e non clinici.^{6,7}
9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la presenza di microrganismi è indicata da un grado variabile di torbidità, da granelli o flocculazione nel brodo di coltura.





10 - 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.¹⁰

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
S. Typhimurium ATCC 14028	33-37° / 18-24H / A	buona crescita dopo trapianto su MacConkey Agar
S. flexneri ATCC 12022	33-37° / 18-24H / A	buona crescita dopo trapianto su MacConkey Agar
E. coli ATCC 25922	33-37° / 6-8 H / A	inibizione da parziale a completa dopo trapianto su MacConkey Agar

A: incubazione in aerobiosi; 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 provette pronte all'uso di GN Broth Hajna e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere GN Broth Hajna REF 401524) vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività del terreno è valutata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni appropriate di ceppi target nelle provette, incubando a 35-37°C per 18-24 ore e registrando la diluizione più alta ove si osserva crescita, nel Lotto di Riferimento (Cr_{LR}) e nel lotto in esame (Cr_{LE}). La produttività è valutata con i seguenti ceppi target: S.Typhimurium ATCC 14028, S.Enteritidis NCTC 5188, S.flexneri ATCC 12022, S.sonnei ATCC 9290, S.boydii ATCC 9207. L'indice di produttività ($Cr_{LR}-Cr_{LE}$) per ciascun ceppo è giudicato conforme quando è ≤ 1 .

La selettività del terreno è valutata con metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni appropriate di ceppi non target nelle provette, incubando a 35-37°C e registrando la diluizione più alta ove si osserva crescita, nel Lotto di Riferimento (Cr_{LR}) e nel lotto in esame (Cr_{LE}). La selettività è valutata con i seguenti ceppi non target: E.coli ATCC 25922, P.vulgaris ATCC 9484 (incubazione per 6-8 ore), E.faecalis ATCC 19433 e S.aureus ATCC 25923 (incubazione per 18-24 ore). L'indice di selettività ($Cr_{LR}-Cr_{LE}$) per ciascun ceppo è giudicato conforme quando è ≥ 1 .

12 - LIMITI DEL METODO

- Poiché alcuni saprofiti (non patogeni) possono crescere nel terreno durante un'incubazione prolungata, il trapianto dopo 6-8 ore si rende necessario per il recupero ottimale dei patogeni enterici.²
- GN Broth non è il brodo di crescita ottimale per *Shigella dysenteriae*.
- GN Broth non deve essere utilizzato da solo come terreno di isolamento ma utilizzato insieme a terreni in piastra selettivi e non selettivi per l'isolamento di *Salmonella* e *Shigella* soprattutto quando questi patogeni possono essere presenti a basse concentrazioni.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra d'isolamento dopo l'arricchimento in GN Broth Hajna, 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 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 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 prodotti 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 provetta del prodotto qui descritto è monouso. Non suddividere il prodotto in altri contenitori.
- Fare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare le provette dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo 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.
- 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.

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. Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, sedimenti, colore alterato).



**15 - BIBLIOGRAFIA**

- Hajna AA. A new enrichment broth medium for gram-negative organisms of the intestinal group. Public Health Lab 1955; 13:83-89.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- Croft CC, Miller MJ. Isolation of *Shigella* from rectal swabs with Hajna "GN" broth. Am J Clin Pathol 1956; 26:411-417.
- Taylor WI, Schelhart D. Isolation of shigellae. V. Comparison of enrichment broths with stools. App Microbiol 1968; 16:1383-1386
- Taylor WI, Schelhart D. Isolation of shigellae. IV. Comparison of plating media with stools. Amer J Clin Pathol 1967; 48:356-362.
- Downes and Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Bonadonna L, Ottaviani M. Rapporti ISTISAN 07/5 Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici. ISS, 2007.
- Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. In Jorgensen JH, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015
- Buchan BW et al. *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
- CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile 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
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	04/2021
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

