

**ISTRUZIONI PER L'USO**

NUTRIENT AGAR

Terreno di coltura pronto all'uso in flacone

*Salmonella Typhimurium* su Nutrient Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale per la coltivazione, la subcoltura e la purificazione delle colonie di microrganismi non esigenti, isolati da campioni clinici e non clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 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

Nutrient Agar è un terreno a base di peptoni di carne utilizzato per la coltivazione dei microrganismi non particolarmente esigenti sotto il profilo delle richieste nutritive. I peptoni forniscono carbonio, azoto e vitamine sufficienti per la crescita della maggior parte dei microrganismi non esigenti (enterobatteri, stafilococchi). L'assenza di sodio cloruro limita il fenomeno della sciamatura dei protei. La formulazione del Nutrient Agar è conforme a quanto indicato da ISO 6579¹ ed ISO 10273². Il Nutrient Agar è stato tra i primi terreni utilizzati in microbiologia e tuttora può essere usato per l'esame delle acque, degli alimenti, per preparare colture stock, per la purificazione delle colonie, per la coltivazione preliminare di un campione da sottoporre a successivi esami batteriologici e sierologici, per l'isolamento dei microrganismi in coltura pura.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sciogliere il contenuto del flacone in un'autoclave a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ o in un bagnomaria termoregolato a 100°C . In alternativa, il flacone può essere posto in un recipiente contenente acqua, che viene posta su una piastra riscaldante e portata ad ebollizione; allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare il terreno a $47-50^\circ\text{C}$ e, distribuire in piastre o provette sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno	terreno limpido di colore giallo molto chiaro
pH finale a 25°C	$7,0 \pm 0,2$

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Nutrient Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5118102	6 x 100 mL; 6 flaconi di vetro con tappo a vite in scatola di cartone CND: W0104010306; EDMA 14.01.03.01; RDM: 1829273/R

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria o piastra riscaldante, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, provette sterili, anse, aghi, tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

Generalmente il terreno qui descritto è utilizzato per la sub-coltura di microrganismi isolati su altri terreni di coltura e non si presta all'inoculo diretto di campioni clinici o non clinici.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre e/o le provette a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno in piastra.

Terreno in piastra

Inoculare 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. Per attività di routine incubare a $35-37^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

L'utilizzatore è comunque 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 coltivare e dei protocolli operativi locali applicabili.

Terreno in provetta

Inoculare con l'ansa sulla superficie del clarino. Normalmente una temperatura di incubazione di $35-37^\circ\text{C}$ per 18-24 ore è adeguata alla coltivazione di aerobi comuni e anaerobi facoltativi. Incubare alla temperatura e per il tempo previsto dalle proprie procedure ed in funzione del microrganismo che si desidera coltivare.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di microrganismi è indicata dalla comparsa di colonie di varia morfologia e dimensione. Le caratteristiche delle crescite sono in stretto rapporto al tipo o ai tipi di microrganismi coltivati

11 - CONTROLLO QUALITÀ



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 responsabilità 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
S. Typhimurium	ATCC 14028	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita
<i>Y.enterocolitica</i>	ATCC 23715	29-31°C / 18-24H / A	buona crescita

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 flaconi pronti all'uso e della materia prima impiegata per la produzione, terreno in polvere Nutrient Agar (test batch: TB), viene testato per la produttività confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato (RB).

La produttività è testata con metodo quantitativo con i seguenti ceppi: *E.coli* ATCC 25922, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *Y.enterocolitica* ATCC 23715. Le piastre vengono inoculate con appropriate diluizioni decimali in soluzione salina delle sospensioni delle colonie ed incubate a 35-37°C (*E.coli*, *S.Typhimurium*) ed a 29-31°C (*Y.enterocolitica*) per 18-24 ore. Le colonie sviluppate sulle piastre sono contate per entrambi i lotti ed è calcolato il rapporto di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Se $Pr \geq 0,7$ i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. La produttività del Nutrient Agar è altresì valutata con tecnica ecometrica semiquantitativa con i ceppi *S.aureus* ATCC 6538 ed *E.faecalis* ATCC 19433. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore viene valutata e registrata l'entità della crescita. I ceppi seminati mostrano una buona crescita.

13 - LIMITI DEL METODO

- Le colonie microbiche presenti sul terreno, 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 in flacone 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.
- Fare attenzione quando si aprono i flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire sufficientemente a lungo per sciogliere l'intero terreno.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la procedura di liquefazione del terreno. Non mettere i flaconi caldi a contatto con il ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento poiché ciò potrebbe causare rotture del vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno può variare considerevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume del flacone.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre e/o le provette non utilizzate e le piastre e/o le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto 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.
- 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 i flaconi oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. I flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente per la preparazione di piastre e/o provette. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, torbidità anomala, colore alterato, presenza di precipitato).

L'utilizzatore è responsabile della correttezza della preparazione delle provette e/o delle piastre. L'utilizzatore è responsabile della validazione della shelf life delle piastre e delle provette preparate, in funzione del metodo di stoccaggio applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA





1. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of Salmonella spp.
2. ISO 10273:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection of pathogenic Yersinia enterocolitica.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF 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
Revisione 5	Aggiornamento del layout e del contenuto in accordo a IVDR 2017/746	09/2021

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

