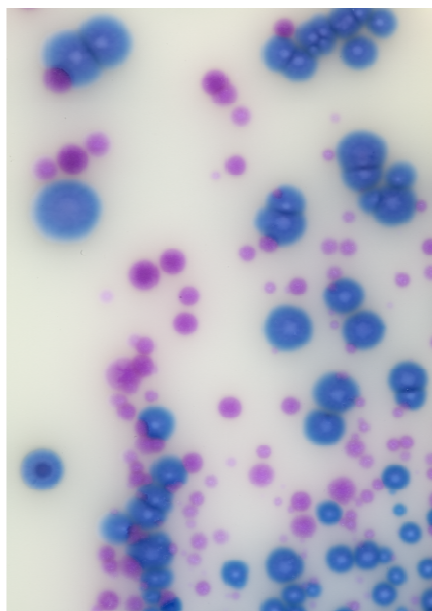


ISTRUZIONI PER L'USO

ChromArt

CHROMOGENIC STREPTO B AGAR BASE
CHROMOGENIC STREPTO B SUPPLEMENT
Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo

Strepto B Medium: coltura mista di *Streptococcus agalactiae* (colonie rosso-magenta) ed *Enterococcus* spp. (colonie blu)

1- DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno cromogeno di base e supplemento selettivo per la determinazione presuntiva degli streptococchi di gruppo B di Lancefield (*Streptococcus agalactiae*; GBS) in campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA ***Chromogenic Strepto B Agar Base (REF 408010)**

Peptoni	28,000 g
Sali tampone	5,250 g
Fattori di crescita	6,700 g
Miscela di sali inorganici	8,500 g
Miscela di antimicrobici	0,027 g
Miscela di cromogeni	0,300 g
Opacizzante	6,500 g
Agar	15,000 g

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

CONTENUTO DEL FLACONE**Chromogenic Strepto B Supplement (REF 4240053)**

Miscela di antimicrobici	0,04 g
Miscela di cromogeni	0,05 g

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Gli streptococchi di gruppo B di Lancefield (SGB), o *Streptococcus agalactiae*, sono cocci Gram positivi, anaerobi facoltativi, ossidasi negativi, catalasi negativi, che causano malattie invasive principalmente nei neonati, nelle donne in gravidanza o dopo il parto, negli anziani e, con l'incidenza più alta, tra i bambini piccoli.^{1,2}

Nonostante i sostanziali progressi nella prevenzione della malattia perinatale da streptococco di gruppo B iniziati negli anni '90, lo SGB rimane la principale causa di sepsi neonatale ad esordio precoce. Lo screening universale tra la 35^a e la 37^a settimana di gestazione per la determinazione della colonizzazione materna e l'uso della profilassi antibiotica intrapartum, hanno portato a riduzioni sostanziali della malattia da SGB ad esordio precoce tra i neonati.²

Risultati migliori nell'isolamento dello SGB, rispetto alla sola coltura vaginale o cervicale, si ottengono con le procedure di arricchimento selettivo, seguite da semina su terreni selettivi e non selettivi, applicate a tamponi vaginali ed ano-rettali.¹⁻³

Chromogenic Strepto B Agar è un terreno selettivo e cromogeno per l'isolamento degli streptococchi di gruppo B (*S.agalactiae*) da campioni clinici e per la differenziazione delle colonie in base allo sviluppo di un colore tipico.

Il terreno è costituito da una base nutritiva tamponata contenente antibiotici e composti cromogeni. I batteri Gram-negativi sono fortemente inibiti mentre la crescita dei batteri Gram-positivi diversi da SGB è inibita con estensione diversa a seconda del genere e della specie batterica. Le caratteristiche differenziali si basano su specifiche reazioni enzimatiche, che permettono la differenziazione delle colonie di *S.agalactiae* (rosa-magenta) da quelle di altri batteri non inibiti dagli agenti selettivi (es. Enterococchi) che crescono con colonie verde-blu, blu, senza o con un alone rosa o incolori. Lo sfondo bianco opaco aiuta a riconoscere meglio i colori delle colonie.

4- METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 35,14 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere, con le precauzioni dell'asepsi, il contenuto di un flacone di Chromogenic Strepto B Supplement (REF 4240053) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE
CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, rosata
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra	terreno opaco, biancastro
pH finale a 25 °C:	7,2 ± 0,2

CARATTERISTICHE DEL SUPPLEMENTO

Aspetto del liofilizzato	alta compatta, gialla
Aspetto della soluzione	giallastra, opalescente



**6- MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Chromogenic Strepto B Agar Base CND W0104010101; EDMA: 14.01.01.01; RDM:1421641	Terreno in polvere	4080102	500 g (7,1 L)
Chromogenic Strepto B Supplement CND W0104010104; EDMA: 14.01.01.04; RDM: 1421677	Supplemento liofilizzato	4240053	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 - 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.

8 - CAMPIONI

I campioni sono costituiti da tamponi materni vaginali e anorettali bassi, raccolti e posti in un terreno di trasporto appropriato (Amies o Stuart con o senza carbone).^{1,4} Pur in presenza di una diminuzione della carica, la vitalità di *S.agalactiae* è preservata nel terreno di trasporto mantenuto a temperatura ambiente oppure a 4°C per un massimo di 4 giorni.⁴ I tamponi vaginali alti sono sconsigliati poiché hanno una sensibilità inferiore.¹ Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici; quando possibile raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antibiotica.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente mantenendole al buio.

Il terreno può essere impiegato per semina diretta del campione sulla superficie della piastra o per semina con una ansata di crescita ottenuta nel terreno liquido di arricchimento Todd Hewitt CNA Broth. Quest'ultima procedura è raccomandata poiché validata nello studio clinico riportato oltre e poiché aumenta la sensibilità e la specificità del metodo.

- Rimuovere con le cautele dell'asepsi il tappo del contenitore del campione ed introdurre i tamponi in Todd Hewitt CNA Broth, rompere (o tagliare) i bastoncini del tampone e riposizionare il tappo. I tappi devono essere tenuti allentati durante l'incubazione. Incubare a 35-37°, in atmosfera al 5% di CO₂, per 18-24 ore.
- Con un'ansa sterile trapiantare dal brodo su piastra di Chromogenic Strepto B Agar e strisciare l'inoculo sulla superficie dell'agar.
- Per l'inoculo diretto, rotolare il / i tampone / i su una piccola area della superficie vicino al bordo piastra quindi strisciare da questa area inoculata.
- Incubare le piastre inoculate a 35-37°C, in aerobiosi, per 24-48 ore.

La lettura alle 24 ore è possibile in casi di urgenza ma aumenta il tasso di false positività. In ogni caso la lettura definitiva dei risultati deve essere fatta dopo incubazione per 48 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

- Colonie tipiche di *S.agalactiae*: colonie rotonde di dimensioni variabili, rosa o rosa-magenta o magenta. La maggior parte dei ceppi alle 48 ore di incubazione sviluppa colonie rotonde di buone dimensioni (3-4 mm) di color magenta. Alle 24 ore alcuni ceppi di *Enterococcus* sviluppano piccole colonie rosa oppure rosa con sfumature grigie o presentano due tipologie di piccole colonie: rosa e grigie. Di norma le colonie di questi ceppi alle 48 ore mostrano una decisa colorazione blu oppure grigio-blu oppure viola.
- La presenza di colonie blu, verde blu, grigio blu, viola con o senza alone magenta o incolore deve essere interpretata come appartenenti a specie diverse da *S.agalactiae* ed il campione deve essere considerato come negativo.

11 - CONTROLLO QUALITA' 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 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
<i>S.agalactiae</i> ATCC 13813	35-37°C / 44-48H / A	crescita, colonie rosa-magenta
<i>E.faecalis</i> ATCC 19433	35-37°C / 44-48H / A	crescita, colonie blu
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	35-37°C / 44-48H / A	inibito

A: aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le prestazioni del Chromogenic Strepto B Agar sono state valutate in uno studio clinico da un Laboratorio di Microbiologia clinica indipendente su 225 campioni vaginali/rettali arricchiti in Todd Hewitt CNA Broth, avendo come riferimento un analogo terreno cromogeno presente sul mercato. I risultati positivi sono stati confermati con il test di agglutinazione al lattice.

168 campioni sono risultati negativi con entrambi i terreni; 44 campioni sono risultati positivi con entrambi i terreni. 3 campioni sono risultati positivi con Chromogenic Strepto B Agar, negativi con il terreno cromogeno di riferimento e confermati come Streptococchi di gruppo B con il test al lattice. 4 campioni su Chromogenic Strepto B Agar e 5 campioni sul terreno cromogeno di riferimento hanno dato origine a piccole colonie rosa, indicate in tabella con la categoria "falsi positivi", identificate poi come appartenenti al genere *Enterococcus*. 1 ceppo, identificato con il test al lattice non di gruppo B, ha fornito risultati "dubbi" e considerato come falso positivo (piccole colonie rosa su entrambi i terreni).

Chromogenic Strepto B Agar non ha dato origine ad alcun falso negativo: sensibilità 100%

Chromogenic Strepto B Agar ha dato origine a 5 falsi positivi (specificità 97,2 %)

Alle 24 ore di incubazione 5 campioni sono risultati negativi sul terreno di riferimento e positivi su Chromogenic Strepto B Agar, tali campioni hanno sviluppato crescite caratteristiche anche sul terreno di riferimento dopo 48 ore di incubazione. Questo elemento e le osservazioni sperimentali di carattere generale hanno dimostrato crescite tipiche più rapide su Chromogenic Strepto B Agar rispetto al terreno cromogeno di riferimento.





Le prestazioni del Chromogenic Strepto B Agar sono state inoltre valutate con 20 ceppi di collezione di *S.agalactiae*: tutti i ceppi hanno fornito crescite tipiche entro 24 ore di incubazione su entrambi i terreni cromogeni.

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Chromogenic Strepto B Agar Base REF 408010, addizionato di Chromogenic Strepto B Supplement REF 4240053, vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *S.agalactiae* ATCC 13813, *S.agalactiae* ATCC 12386, 3 ceppi d'isolamento clinico identificati come streptococchi di gruppo B. Dopo incubazione a 35-37°C per 48 ore complete in aerobiosi, i ceppi target mostrano buone crescite con caratteristiche cromatiche tipiche (colonie rosa-magenta).

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate, con metodo ecometrico semiquantitativo, appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non-target: *E.gallinarum* ATCC 49573, *E.faecium* ATCC 700221, *E.faecalis* ATCC 19433, *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.saprophyticus* ATCC 15305, *S.xylosus* ATCC 35033, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *C.albicans* ATCC 10231. Dopo incubazione a 35-37°C per 48 ore complete, la crescita di *P.aeruginosa* e *C.albicans* è totalmente inibita, la crescita di *E.gallinarum*, *S.saprophyticus*, *S.xylosus*, è parzialmente inibita con lo sviluppo di colonie blu chiaro, la crescita di *S.pyogenes* e *S.pneumoniae* è parzialmente inibita con lo sviluppo di piccole colonie rosa, mentre *E.faecalis* ed *E.faecium* non sono inibiti e crescono con colonie blu o blu - grigie.

13 - LIMITI DEL METODO

- È possibile che pochi ceppi di *S.agalactiae* con esigenze di crescita specifiche non crescano su questo terreno. Il rilevamento ottimale degli streptococchi di gruppo B può richiedere l'uso di più di un terreno di coltura (ad es. terreno selettivo e agar sangue).¹
- Alcune specie (ad esempio *Enterococcus* spp.) resistenti agli antibiotici possono svilupparsi e produrre colonie con un colore non tipico. Tuttavia, durante le prove di convalida, 5 ceppi di enterococchi hanno prodotto piccole colonie rosa.
- Gli streptococchi di gruppo A e gli pneumococchi possono produrre piccole colonie rosa.
- La lettura finale e l'interpretazione dei risultati devono essere eseguite dopo un periodo di incubazione completo di 48 ore.
- 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 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

- I prodotti qui descritti sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato.
- I terreni in polvere ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime 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 di sicurezza 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, in provetta o in fiasca.
- Chromogenic Strepto B Supplement è sottoposto a sterilizzazione con membrana filtrante.
- Porre molta attenzione nell'apertura della ghiera metallica dei flaconi dei supplementi per evitare lesioni.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti 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

Terreno in polvere: Conservare a +2°C /+8°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplementi selettivi: Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C /+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 preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations (SMI) Bacteriology, B58, Issue no:3, Issue date: 26.06.18 Detection of Carriage of Group B Streptococci (*Streptococcus agalactiae*).
2. Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. MMWR Recomm. Rep. 2010 Nov 19; 59 (RR-10):1-36
3. Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, Cools P, Verstraelen H et al. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B streptococcus carriage in pregnant women. BMC Infect Dis 2010;10:285.
4. Spellerberg B, Brandt C, Sendi P. *Streptococcus*. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>In vitro</i>	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
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 2	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	12/2021

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

