

ISTRUZIONI PER L'USO

BLOOD AGAR BASE

Terreno di coltura in polvere



Blood Agar: Streptococco beta emolitico di gruppo A

1- DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno di base non selettivo da impiegare tal quale o con arricchimenti (es. sangue animale) per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi esigenti e non, da campioni clinici e da altri materiali e per la determinazione dell'emolisi batterica.

2- COMPOSIZIONE
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOGNIMENTO IN ACQUA)*

Estratto di carne	10 g
Triptosio	10 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Blood Agar Base è un terreno d'uso generale utilizzabile tale quale o addizionato di varie sostanze quali sangue, siero, carboidrati. L'estratto di carne ed il triptosio sono fonte di composti di carbonio, di azoto e di oligoelementi necessari alla crescita microbica; il sodio cloruro contribuisce al bilanciamento osmotico del terreno.

Senza aggiunte, il terreno può essere impiegato come agar nutriente piuttosto ricco o come terreno per il mantenimento a breve termine delle colture microbiche.

Con l'aggiunta di siero o altri arricchimenti, il terreno diventa adatto per la coltivazione dei microrganismi esigenti quali streptococchi, pneumococchi, meningococchi, *Haemophilus*.

Aggiunto di sangue defibrinato sterile di montone o di cavallo, il terreno si presta bene per la determinazione dell'attività emolitica di streptococchi, stafilococchi ed altri microrganismi. Addizionato di sangue di montone, il terreno è particolarmente adatto per l'isolamento di *Streptococcus pyogenes*.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 40 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare all'ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed addizionare, se richiesto, il 5% di sangue defibrinato sterile di montone. Mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea di colore beige
Aspetto del terreno in soluzione	giallo limpido
Aspetto del terreno in piastra con sangue	terreno opaco di colore rosso-sangue intenso.
pH finale a 25 °C	7,4 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Blood Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4011552	500 g (12,5 L)
		4011554	5 kg (125 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, anse e tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, materiali per la generazione dell'atmosfera di incubazione controllata.

8 - CAMPIONI

Le piastre preparate con Blood Agar Base, addizionato di sangue defibrinato di montone, 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.^{1,3} Il terreno non è indicato 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.¹





9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

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

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 aerobiosi o in atmosfera al 5-10% di CO₂ ed osservare dopo 18-24, 48 e, se necessario, 72 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.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Su piastre di Blood Agar Base, addizionato di sangue defibrinato di montone si possono evidenziare i seguenti tipi di emolisi:

1. α-haemolysis: emolisi parziale delle emazie con la formazione di alone grigio-marrone-verdastro attorno alle colonie.
2. β-haemolysis: emolisi completa dei globuli rossi con la formazione di una zona trasparente attorno alle colonie.
3. γ o non-emolisi: i globuli rossi non sono emolizzati e non vi è alcuna modifica del terreno attorno alle colonie.
4. Emolisi α-prime: presenza di una piccola zona di emolisi completa del sangue attorno alla colonia, circondata da un alone di lisi parziale delle emazie di colore verdastro; questo tipo di emolisi è piuttosto rara.

Di seguito sono riepilogate le caratteristiche delle colonie di alcuni microrganismi che si possono rinvenire sulle piastre di agar sangue di montone.⁴

- Le colonie degli Streptococchi del gruppo A sono circondate da una zona ben definita di emolisi completa del sangue (β-emolisi), di solito ampia due o tre volte il diametro della colonia.
- Le colonie degli streptococchi di gruppo B sono circondate da una zona più piccola di emolisi completa; alcuni ceppi non lisano affatto il sangue.
- L'aspetto delle colonie degli Streptococchi del gruppo C e del gruppo G non differiscono in modo sufficiente da quello delle colonie del gruppo A per avere un valore nell'identificazione.
- Le colonie degli Streptococchi di gruppo D sono non emolitiche
- Le colonie di Pneumococchi, con incubazione in CO₂, sono circondate da una zona abbastanza grande di α-emolisi.
- Le colonie degli Streptococchi *viridans* possono essere circondate da una piccola zona di α-emolisi o non avere alcuna zona di emolisi.
- Le colonie degli Stafilococchi sono gialle o bianche con o senza la zona di β-emolisi.
- Le colonie di *Listeria monocytogenes* sono circondate da una piccola zona β-emolitica.

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 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>S. pyogenes</i>	ATCC 19615	35-37°C / 24H / A o CO ₂	buona crescita, beta emolisi
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 6305	35-37°C / 24H / A o CO ₂	buona crescita, alfa emolisi
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	35-37°C / 24H / A o CO ₂	buona crescita
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	35-37°C / 24H / A o CO ₂	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 terreno in polvere Blood Agar Base, non supplementato ed addizionato di sangue defibrinato di montone, sono testati per la produttività e per l'emolisi, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività del terreno addizionato di sangue defibrinato di montone è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *S. agalactiae* ATCC 12386, *S. aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h in aerobiosi, si osservano le caratteristiche emolitiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano emolisi tipiche e buone crescite.

La produttività del terreno non supplementato è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi: *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922, *S. epidermidis* ATCC 1228, *C. albicans* ATCC 18804. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h in aerobiosi ore si osserva l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano buone crescite, comparabili con il Lotto di Riferimento.

13 - LIMITI DEL METODO

- A seconda dei campioni analizzati e dei microrganismi da isolare, si raccomanda, per l'esame dei campioni clinici, di utilizzare anche mezzi colturali aggiuntivi come terreni selettivi e agar-cioccolato.
- La crescita ed il tipo di emolisi sul terreno qui descritto dipendono dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo; è possibile che alcuni ceppi non siano in grado di coltivare sul terreno e/o dimostrino modelli emolitici diversi dall'atteso.
- Su questo terreno addizionato di sangue di montone, non cresce *Haemophilus influenzae*, che richiede sia il fattore X che il fattore V,⁵ né si sviluppano adeguatamente *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Bordetella* ed altri microrganismi con particolari esigenze nutritive. Per l'isolamento di queste specie utilizzare terreni di coltura specifici.
- *Haemophilus haemolyticus* sviluppa colonie beta-emolitiche con sangue di cavallo e di coniglio mentre non coltiva sul terreno addizionato di sangue di montone.
- Le reazioni emolitiche di alcuni ceppi di streptococchi di gruppo D sono influenzate dal tipo sangue impiegato: sono beta-emolitici con sangue di cavallo e sangue umano e di coniglio e alfa-emolitici con sangue di montone.
- L'atmosfera di incubazione influenza le reazioni emolitiche degli streptococchi beta-emolitici: per prestazioni ottimali, incubare il terreno di base con sangue in atmosfera al 5-10% di CO₂ o in condizioni anaerobiche.





- 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

- 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.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda 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.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, 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

Conservare a +10°C /+30°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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

16 - BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.
- Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
- Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg H.D. and Shadomy, H.J. (ed) (1991) In Manual of Clinical Microbiology, 5th edition, Washington, DC: American Society for Microbiology; 1991.
- Nye KJ, Fallon D, Gee B, Messer S, Warren RE, Andrews N. A comparison of blood Agar supplemented with NAD with plain blood agar and chocolate blood agar in the isolation of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus Influenzae from sputum. Bacterial Methods Evaluation Group J Med Microbiol 48 (12), 1111-1114 Dec 1999

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

