

ISTRUZIONI PER L'USO

BLOOD AGAR BASE N°2

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 con spiccate proprietà nutritive da impiegare 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 SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Peptone	15,0 g
Estratto di fegato	2,5 g
Estratto di lievito	5,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Agar	13,0 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 N ° 2 è un terreno d'uso generale con proprietà nutritive più ricche di altri terreni di base per agar-sangue e con capacità particolari di promuovere la produzione di pigmenti da parte dei batteri; può essere utilizzato con l'aggiunta di vari arricchimenti come sangue, siero, carboidrati per la coltivazione di microrganismi esigenti.

Il peptone, l'estratto di fegato e l'estratto di lievito sono fonti di carbonio, azoto, vitamine ed oligoelementi necessari per la crescita microbica; il cloruro di sodio contribuisce all'equilibrio osmotico del terreno.

Con l'aggiunta di siero o altri arricchimenti, Blood Agar Base n ° 2 è adatto alla coltivazione di microrganismi esigenti come streptococchi, pneumococchi, meningococchi, emofili.

Addizionato con sangue defibrinato sterile di montone o di cavallo, il terreno è utilizzato per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi esigenti e non da campioni clinici e da altri materiali e per la determinazione delle proprietà emolitiche di streptococchi, stafilococchi ed altri microrganismi. Con l'aggiunta di sangue di montone, il terreno è particolarmente adatto per l'isolamento di *Streptococcus pyogenes*.

Blood Agar Base N ° 2 è conforme alla formulazione riportata da FDA-BAM¹ Le formulazioni secondo gli standard ISO 7932² e 11290³ differiscono per i valori di pH finali (ISO 7032:7,0±0,2; ISO 11290: 7,2±0,2).

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 40,5 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 aggiungere, 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 giallo chiaro

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	Cat. N°	Confezione
Blood Agar Base N°2	Terreno di coltura in polvere	4011562	500 g (12,3 L)
		4011564	5 kg (123 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, sangue animale, materiali per la generazione dell'atmosfera di incubazione controllata.

8 - CAMPIONI

Le piastre preparate con Blood Agar Base N°2, 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.³⁻⁵ 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.³





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 N°2, addizionato di sangue defibrinato di montone si possono evidenziare i seguenti tipi di emolisi:

1. α- emolisi: emolisi parziale delle emazie con la formazione di alone grigio-marrone-verdastro attorno alle colonie.
2. β- emolisi: 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 lisati 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 / 18-24H / A o CO ₂	buona crescita, beta emolisi
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 6305	35-37°C / 18-24H / A o CO ₂	buona crescita, alfa emolisi
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	35-37°C / 18-24H / A o CO ₂	buona crescita
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / 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 N°2 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 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, *E.coli* ATCC 25922, *L.monocytogenes* ATCC 13932, *L.innocua* ATCC 33090, *B.cereus* ATCC 11778. 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.

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,⁸ 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 di 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, provetta o flacone.
- 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.
- 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

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, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo del terreno e della definizione 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

- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), M22 Blood Agar Base #2
- ISO 7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal Methods for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Colony count technique at 30°C.
- ISO 11290:2107. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal Methods for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp*
- 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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 4	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	02/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

