

CPLM TRICHOMONAS BROTH

Terreno di coltura in polvere

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base a cui aggiungere siero di cavallo e cloramfenicolo per l'isolamento e la coltivazione dei microrganismi appartenenti al genere *Trichomonas*.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA (PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Triptone	20,000 g
Estratto di fegato	12,000 g
Cisteina HCl	1,600 g
Maltosio	1,100 g
Agar	1,000 g
Blu di metilene	0,003 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Trichomonas vaginalis è un flagellato che vive sulla superficie dell'epitelio del tratto urogenitale. Produce tricomoniasi nelle donne, mentre negli uomini l'infezione può essere asintomatica o avere caratteristiche di uretrite, epididimite e prostatite. L'infezione da *Trichomonas vaginalis* è la più comune infezione non virale a trasmissione sessuale.¹ Nel mondo si registrano circa 250 milioni di casi di infezione da *Trichomonas* ogni anno, con una prevalenza complessiva stimata del 4,5%.

La coltura ha una sensibilità maggiore (> 80%) rispetto al metodo dell'osservazione microscopica a fresco ed è considerata il gold standard per la rilevazione di *T. vaginalis*.²

Trichomonas CPLM (Cysteine-Peptone-Liver-Maltose Medium) Selective Broth è una modifica del terreno STS di Kupferberg et al. per la coltivazione di *Trichomonas* spp.³ La formula classica è stata modificata con l'aggiunta di estratto di fegato e siero di cavallo per migliorarne le prestazioni.

Il triptone e l'estratto di fegato forniscono carbonio, azoto, vitamine e minerali per supportare la crescita di *Trichomonas*; il maltosio è una fonte di energia per la crescita microbica. Cisteina ed agar a bassa concentrazione creano condizioni riducenti nel terreno che favoriscono lo sviluppo di *Trichomonas*. Il blu di metilene è incluso come indicatore di ossidoriduzione: allo stato ossidato è di colore verde, allo stato ridotto è incolore. Il cloramfenicolo, un antibiotico relativamente stabile da aggiungere al terreno di base, sostituisce la penicillina e la streptomycin incluse nel terreno STS e sopprime la crescita della maggior parte dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Il siero di cavallo è aggiunto al terreno per fornire fattori di crescita utili per *Trichomonas*.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 35,7 g di CPLM Trichomonas Broth in 950 mL di soluzione di Ringer o in acqua purificata.

Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere 50 mL di siero di cavallo sterile ed il contenuto di due flaconi di Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003), ricostituiti con 3 mL di una miscela acqua/etanolo (1:1). Distribuire in provette sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, grigia.
Aspetto del terreno in soluzione	giallo, limpido.
Aspetto del terreno completo in provetta	giallo con anello verde, limpido.
pH (20-25°C)	6,5 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
CPLM Trichomonas Broth	Terreno di coltura in polvere	4013312	500 g (14 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

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

8 - CAMPIONI

Nelle donne, le secrezioni vaginali sono il tipo di campione preferito per la coltura, poiché la determinazione sulle urine è meno sensibile. Negli uomini, i campioni per la coltura sono tampone uretrale, sedimento urinario e/o sperma; per migliorare la resa, è possibile utilizzare più campioni maschili per inoculare una singola provetta.⁴ I campioni devono essere raccolti correttamente e inoculati immediatamente nel terreno. Per informazioni dettagliate, consultare i testi appropriati.⁴⁻⁶ Raccogliere i campioni prima della terapia antimicrobica, quando possibile.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le provette a temperatura ambiente o preferibilmente a 37°C. Inoculare il terreno scaricando il tampone con cui si è raccolto il campione o con appropriati metodi alternativi.

Incubare le provette a 35 ± 2°C in atmosfera aerobica per 2-7 giorni.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo 48 ore di incubazione e di nuovo giornalmente, rimuovere asetticamente una goccia di coltura e posizionarla su un vetrino e coprire con un vetrino copri-oggetto. Esaminare al microscopio con ingrandimento 100x-400x. Non mescolare la coltura, ma rimuovere il materiale dal fondo della provetta, con una pipetta sterile.





Una coltura positiva è definita dalla visualizzazione di trofozoiti con morfologia (a forma di pera) e motilità (a foglia cadente) caratteristiche di *T. vaginalis*.

Il risultato negativo è definito dall'assenza di *Trichomonas mobili* dopo 7 giorni di incubazione.

11 - 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:

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>T. vaginalis</i> ATCC 30001	35-37 °C / fino a 72h / A	osservazione di forme tipiche mobili
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	35-37 °C / fino a 72h / A	crecita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37 °C / fino a 72h / A	inibito

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

12 - LIMITI DEL METODO

- *T. vaginalis* può crescere senza produrre evidenti segni di torbidità nel terreno di coltura.
- La coltura ha una sensibilità del 75% -96% e una specificità fino al 100%.^{4,7} Un risultato negativo deve essere considerato con cautela e valutato insieme ai sintomi clinici.
- Il terreno non contiene agenti antimicotici quindi lieviti come *Candida* spp. possono crescere nei tubi inoculati con i campioni.
- Anche se il brodo contiene cloramfenicolo per ridurre la contaminazione da flora vaginale, la contaminazione da batteri può costituire un problema. Potrebbe essere necessario una sub-coltura delle colture dopo 2-3 giorni di incubazione per ridurre la contaminazione batterica e per identificare definitivamente *T. vaginalis*.
- A causa della natura fastidiosa di *T. vaginalis*, la coltura rimarrà vitale per un breve periodo di tempo dopo aver raggiunto la fase stazionaria.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è 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.
- 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.

14 - 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 dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. McConnaughey M. Life Cycle of Parasites. Reference Module in Biomedical Sciences, 2014.
2. Novak-Weekley SN, Leber AL. Intestinal and urogenital amebae, flagellates and ciliates. In Carrol KC, Pfaller MA *et al.* editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
3. Kupferberg AB, Johnson G, Sprince H. 1948. Nutritional requirements of *Trichomonas vaginalis*. Proc Soc Exp Biol Med 1948;67:304-308.
4. Centers of Disease Control and Prevention, 2015 Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. June 4, 2015.
5. Shimizu RY, Garcia LD. Specimen collection, transport, and processing: parasitology. In Carrol KC, Pfaller MA *et al.* editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
6. Hobbs MM *et al.* Methods for Detection of *Trichomonas vaginalis* in the Male Partners of Infected Women: Implications for Control of Trichomoniasis. J Clin Microbiol. 2006; 44(11): 3994-3999.
7. Nye MB, Schwebke JR, Body BA. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. Am J Obstet Gynecol 2009;200: 181-7.
8. Domeika M, Zhuravskaya L, Savicheva A, Frigo N, Sokolovskiy E, Hallén A, Unemo M, Ballard RC. Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries. EE SRH Network Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. First published: 02 September 2010.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente <n> per test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020

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

