

PPLO AGAR PPLO ENRICHMENT BROTH Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

PPLO Agar e PPLO Enrichment Broth, integrati con arricchimenti nutritivi e supplementi selettivi, vengono utilizzati per isolare e coltivare il *Mycoplasma*.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

PPLO AGAR

Estratto di cuore di manzo	5,0 g
Tryptone	10,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Agar	15,0 g

PPLO ENRICHMENT BROTH

Estratto di cuore di manzo	5,0 g
Tryptone	10,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Violetto cristallo	10 mg

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Mycoplasma è un genere di batteri che, come gli altri membri della classe *Mollicutes*, mancano di una parete cellulare attorno alla loro membrana cellulare.

Il primo micoplasma isolato fu l'agente della pleuropolmonite bovina, segnalato inizialmente nel 1898 da Nocard e Roux¹. Questo batterio divenne noto nei successivi 50 anni come "organismo simile alla pleuropolmonite" o PPLO, in vari animali.²

PPLO Agar e PPLO Enrichment Broth sono terreni di base altamente nutritivi, che dovrebbero essere integrati con agenti selettivi e arricchimenti per l'isolamento, la coltivazione e il mantenimento dei micoplasmi. PPLO Agar è preparato secondo le formulazioni descritte da Morton, Smith e Leberman³ mentre PPLO Enrichment Broth è preparato secondo la formulazione di Morton e Lecce⁴. L'estratto di cuore di bue e il triptone sono gli ingredienti base per la crescita delle *Mycoplasmataceae*. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il cristallo violetto in PPLO Enrichment Broth è un agente selettivo contro i batteri Gram-positivi. I ceppi patogeni crescono su PPLO Agar integrato con estratto di lievito fresco e siero di cavallo, come riportato da Hayflick⁵. Il siero ottenuto da fonti animali, quando aggiunto a PPLO Agar, mostra effetti inibitori su alcuni ceppi di micoplasma, per questo motivo si consiglia l'aggiunta di frazioni sieriche libere da gammaglobuline al terreno di base.⁶

PPLO Agar può essere reso selettivo incorporando acetato di tallio, penicillina G, che inibisce i batteri Gram-positivi, e amphotericina B, che inibisce la crescita fungina.⁶ PPLO Agar può essere integrato con 0,2 mL/L di soluzione di blu di metilene all'1% per ottenere una crescita selettiva di *M. pneumoniae* e cloruro di tetrazolio per differenziare *M. pneumoniae* dalle altre specie. PPLO Enrichment Broth può essere addizionato di glucosio e di un indicatore di pH come il rosso fenolo per la visualizzazione del viraggio dal viola al giallo del terreno dovuto alla fermentazione del glucosio.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

PPLO Agar

Sospendere 35 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50-60°C e aggiungere l'arricchimento e i supplementi selettivi richiesti.

PPLO Enrichment Broth

Sospendere 20 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente se necessario per sciogliere completamente la polvere. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50-60°C e aggiungere l'arricchimento e i supplementi selettivi richiesti.

La tabella seguente riassume gli arricchimenti e gli additivi selettivi da utilizzare.⁶ Tutte le soluzioni sterili devono essere aggiunte asetticamente all'agar o al brodo base.

Ingredienti	Agar (mL)	Brodo (mL)	Conc. finale/ mL terreno
PPLO Agar	70		
PPLO Enrichment Broth		70	
Siero di cavallo	20	20	
Estratto di lievito, soluzione al 25%	10	10	
Penicillina G, soluzione	1	1	1000
Amphotericina B soluzione	0.5	0.5	5 µg
Acetato di tallio soluzione	0.5	0.5	500 µg
D-glucosio soluzione		2	10 µg
Rosso fenolo soluzione		1	20 µg

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

PPLO Agar

Aspetto della polvere Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra giallo, limpido
pH finale (20-25 °C) 7,8 ± 0,2

PPLO Enrichment Broth

Aspetto della polvere Fine granulometria omogenea, viola
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra viola, limpido
pH finale (20-25 °C) 7,8 ± 0,2



**6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
PPLO Agar	Terreno di coltura in polvere	4019452	500 g (14,3 L)
PPLO Enrichment Broth	Terreno di coltura in polvere	4019502	500 g (25 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre di Petri, provette con tappo a vite, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Tamponi, espettorato, fluidi corporei, tessuto macerato e altri campioni clinici e non clinici. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**PPLO Agar**

Preparare una diluizione 1:10 e 1:100 del campione in un terreno di coltura adatto, come PPLO broth, per ridurre le potenziali sostanze inibitorie che possono essere presenti.

Inoculare e strisciare il campione appena possibile dopo averlo ricevuto in laboratorio.

Incubare le piastre con nastro adesivo in atmosfera al 5-10% di CO₂ a 35°C per un massimo di 30 giorni. Le piastre possono essere incubate in anaerobiosi se si sospetta *M. buccale*, *M. faucium*, *M. orale* o *M. salivarium*.

Le colonie osservate con un basso ingrandimento (40-60 X) si presentano spesso larghe e piatte con centro scuro di diametro compreso tra 24 e 100 micron. Questi microrganismi si riconoscono grazie alle tipiche colonie minuscole "a uovo fritto" o finemente granulari ("vetro smerigliato"). La porzione centrale delle colonie cresce all'interno del terreno, la porzione periferica cresce in superficie. Le parti periferiche delle colonie mostrano spesso la presenza di vacuoli, caratteristiche degli organismi pleuropolmonari.

PPLO Enrichment Broth

PPLO Enrichment Broth può essere utilizzato per l'arricchimento selettivo di micoplasmi, per la purificazione di colture o in colture bifasiche.⁶ Inoculare direttamente il campione o il campione diluito nel brodo non appena possibile dopo la ricezione in laboratorio. La diluizione del campione riduce al minimo l'effetto degli inibitori batterici sul micoplasma in crescita.

Incubare a 35°C in atmosfera al 5-10% di CO₂ fino a 30 giorni. Esaminare le provette dopo 2, 5, 10, 15, 25 e 30 giorni e seminare aliquote di campioni del brodo su piastre PPLO per visualizzare le colonie tipiche.

10 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO

M. hominis ATCC 15488

INCUBAZIONE T° / T / ATM

35-37°C / fino a 6 gg / CO₂

RISULTATI ATTESI

colonie a "uovo fritto"

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 – LIMITEI DEL METODO

- PPLO Enrichment Broth contiene cristal violetto che inibisce la flora associata, mentre la proliferazione della maggior parte dei micoplasmi non è influenzata dal cristal violetto; le eccezioni sono i micoplasmi del pollame, T e alcuni micoplasmi suini. Secondo Morton e Lecci, i terreni contenenti CV dovrebbero essere integrati con liquido ascitico.⁶
- I micoplasmi dei ceppi T sono sensibili all'acetato di tallio, pertanto i terreni con questo agente selettivo non sono consigliati per i ceppi T (ad es. ureaplasma).⁶
- Kundisin *et al.*⁷ raccomandano l'uso sia di brodo che di terreno agarizzato per l'inoculazione iniziale del campione.

12 - 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 completi di arricchimenti e supplementi selettivi devono essere convalidati dall'utente per gli scopi previsti. Applicare le buone pratiche di fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi 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.



13 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ








Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo MacFaddin i terreni di base possono essere conservati a +2°C /+8°C per circa 6-8 settimane, mentre i terreni con additivi e supplementi selettivi possono essere conservati a +2°C /+8°C per circa 3 -4 settimane.⁶

14 - BIBLIOGRAFIA

1. Nocard E, Roux ER. Le microbe de la peripneumonie. Ann Inst Pasteur (Paris). 1898; 12:240–262
2. Saraya T. The History of Mycoplasma pneumoniae Pneumonia. Front Microbiol. 2016; 7:364
3. Morton H, Smith PF, Leberman PR. Investigation of the cultivation of pleuropneumonia-like organisms from man. Am J Syph Gonorrhea Vener Dis. 1951; 35:361-9.
4. Morton HE, Lecce JG. Selective action of thallium acetate and crystal violet for pleuropneumonia-like organisms of human origin. J Bacteriol 1953 ;66:646-9
5. Hayflick L. Tissue cultures and Mycoplasmas. Texas Rep Biol Med. 1965; 23:285.
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Kundsinn RB, Parreno A, Poulin S. Significance of appropriate techniques and media for isolation and identification of Ureaplasma urealyticum from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1978; 8:445-453.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023

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

