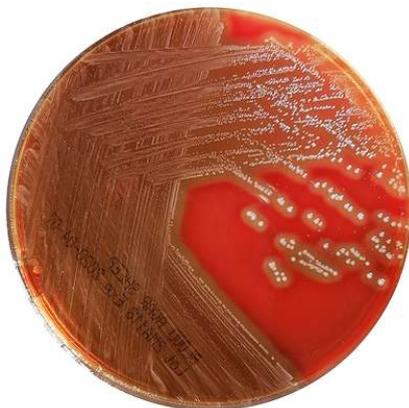


ISTRUZIONI PER L'USO

TRYPTIC SOY BLOOD AGAR BASE

Terreno di coltura in polvere


Tryptic Soy Blood Agar Base
con sangue di montone:
Streptococcus pyogenes.

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale, non selettivo, da usare con sangue defibrinato animale per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi esigenti e non, da campioni clinici ed altri materiali e per la determinazione dell'emolisi batterica.

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

Digerito pancreatico di caseina	14,5 g
Peptone di soia	5,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Agar	14,0 g
Fattori di crescita	1,5 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'origine dell'agar sangue è incerta. L'inclusione del sangue come supplemento nei terreni di coltura sembra precedere l'uso dell'agar¹; nel loro Manuale di Batteriologia del 1903, Muir e Ritchie² ne elencano l'inclusione prima di descrivere l'uso dell'agar-agar in sostituzione della gelatina come agente solidificante.² Il termine "agar sangue", come lo conosciamo oggi, in via generale, si riferisce ad un terreno di base, arricchito con sangue defibrinato di mammifero.

Tryptic Soy Blood Agar Base è un terreno d'uso generale, da usare con sangue defibrinato animale per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi esigenti e non, da campioni clinici ed altri materiali e per la determinazione dell'emolisi batterica.

Tryptic Soy Blood Agar Base è preparato con peptoni di caseina e di soia selezionati per ottenere emolisi ottimali e per fornire azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; il terreno contiene fattori di crescita per incrementare le dimensioni delle colonie dei batteri esigenti e sodio cloruro per mantenere l'equilibrio osmotico del terreno. La presenza del sangue animale defibrinato permette una preliminare differenziazione batterica sulla base del tipo di emolisi espressa.

Sulle piastre di Tryptic Soy Blood Agar Base addizionato di sangue defibrinato di montone è possibile eseguire il CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) test per l'identificazione presuntiva di *S.agalactiae* e depositare dischi di optochina e bacitracina per l'identificazione presuntiva degli Streptococchi di gruppo A.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 40 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed addizionare il 5-7% di sangue defibrinato di montone o di cavallo. Mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, di colore giallo-paglierino

Aspetto del terreno in soluzione

limpido, paglierino

pH (20-25°C)

7,3 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Tryptic Soy Blood Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4021512	500 g (12,5 L)
		4021514	5 kg (125 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, sangue defibrinato animale, anse e tamponi da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Le piastre preparate con Tryptic Soy 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.³⁻⁵ Il terreno non è indicato per la semina diretta di campioni di sangue. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) 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.

CAMP test (piastre con sangue defibrinato di montone): seminare con uno striscio al centro della piastra un ceppo emolitico di *S. aureus* (ATCC 25923). Perpendicolarmente strisciare il ceppo di controllo *S.agalactiae* ATCC 12386 ed i ceppi da esaminare. Si possono testare fino a 5 ceppi per piastra. Incubare in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Su piastre di Tryptic Soy 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.⁶

- 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* sono circondate da una piccola zona β-emolitica.

Una volta che le colonie sono cresciute sulle piastre di Blood Agar Sheep, l'utilizzatore deve differenziare i potenziali patogeni che richiedono l'identificazione e l'antibiogramma, dai contaminanti, membri del normale microbiota del campione.

CAMP test: la reazione positiva è indicata dalla formazione di una zona semicircolare di evidente intensificazione della reazione emolitica alla confluenza con lo striscio di crescita dello *Staphylococcus aureus* ATCC 33862

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 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.⁷

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, β-emolisi
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	35-37°C / 24H / A o CO ₂	buona crescita, α-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 Tryptic Soy 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 ore 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, *S.epidermidis* ATCC 12228, *C.albicans* ATCC 18804. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi ore si osserva l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano buone crescite, comparabili con il Lotto di Riferimento.

Il CAMP test è effettuato con il ceppo di *S.aureus* ATCC 25923 e con *S.agalactiae* ATCC 12386. Dopo incubazione in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore si osserva la caratteristica intensificazione a freccia della zona emolitica del ceppo *S.agalactiae*.

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.





- 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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 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 produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi), del supplemento addizionato e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Buxton T. Blood agar plates and hemolysis protocols. ASM Science, 2005
- Robert M, Ritchie J. 1903. Manual of Bacteriology. The MacMillan Company, London, 1903.
- 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.
- CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
- 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	o REF	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 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 3	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	03/2022
Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

