

ISTRUZIONI PER L'USO

COLUMBIA BLOOD AGAR

Piastre pronte all'uso

 Columbia Blood Agar:
Group A β -haemolytic *Streptococcus*
1 - DESTINAZIONE D'USO

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

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptocomplex	10 g
Triptosio	10 g
Peptone	3 g
Amido di mais	1 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	12 g
Sangue defibrinato di montone	50 mL
Acqua purificata	1000 mL

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Ellner, Stoessel, Drakeford e Vasi¹ della Columbia University, che hanno proposto nel 1966 la formula del Columbia Blood Agar, riportano che la combinazione dei peptoni di carne e di caseina, impiegati nella preparazione del terreno, ha permesso di ottenere risultati superiori per la crescita e per la differenziazione microbica sulla base dell'emolisi, rispetto alle basi per agar sangue precedentemente in uso.

Columbia Blood Agar è un terreno d'uso generale, non selettivo, con sangue defibrinato di montone per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi esigenti e non, come *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., *S.pneumoniae*, *Staphylococcus*, *C.jejuni*, da campioni clinici e per la determinazione dell'emolisi batterica.^{2,3}

Columbia Blood Agar è indicato dalla norma ISO 10272 per la purificazione delle colonie e per il test di conferma con incubazione a 25°C in aerobiosi, nel metodo per la determinazione di *Campylobacter* spp. negli alimenti.⁴

I peptoni forniscono azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno; l'amido di mais, oltre ad essere una fonte di energia per la crescita microbica, ha la funzione di assorbire i sotto-prodotti tossici contenuti nei campioni. La presenza del sangue defibrinato di montone permette una preliminare differenziazione batterica sulla base del tipo di emolisi espressa.

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	rosso-sangue, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,3 ± 0,1

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Columbia Blood Agar	Piastre pronte all'uso	541136	2 x 10 piastre \varnothing 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, materiali per la generazione di una atmosfera di incubazione controllata, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Le piastre di Columbia Blood Agar 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.⁵⁻⁷ Le piastre di Columbia Blood Agar non sono indicate 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.⁵ Per l'esame microbiologico degli alimenti fare riferimento alla norma ISO citata⁴.

8 - 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 tampono 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 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.





9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie e delle aree di emolisi. Di seguito sono riepilogate le caratteristiche delle colonie di alcuni microrganismi che si possono rinvenire sulle piastre di Columbia Blood Agar.⁸

- Le colonie degli Streptococchi del gruppo A hanno in genere un diametro di circa 0,5-1 mm, sono trasparenti o traslucide e a cupola, con una superficie liscia e un bordo intero. 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 generalmente più grandi (2-4 mm di diametro) 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 (*S. bovis*) sono leggermente più grandi delle colonie degli altri streptococchi, sono meno opache, sono sollevate con colore da grigio a grigio-bianco.
- Le colonie di Pneumococchi sono rotonde con bordi interi, mucoidi, di circa 1 mm di diametro; con incubazione in CO₂, sono circondate da una zona abbastanza grande di α -emolisi.
- Le colonie degli Streptococchi *viridans* variano di dimensioni da piuttosto minuscole ad una dimensione simile o maggiore di quella degli Streptococchi del gruppo A. Le colonie sono generalmente più piccole di quelle pneumococciche. Possono apparire mucoidi, traslucide o lucide e non traslucide. Le colonie 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.
- Una volta che le colonie sono cresciute sulle piastre di Columbia Blood Agar, l'utilizzatore deve differenziare i potenziali patogeni che richiedono l'identificazione e l'antibiogramma dai contaminanti, membri del normale microbiota del campione.

10 - 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.⁹

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 registrate di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Columbia Blood Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Columbia Blood Agar Base REF 401136) sono testati per la produttività e per l'emolisi, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con 2 ceppi: *C. jejuni* ATCC 33291 e *C. coli* ATCC 43478. Le piastre sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di una sospensione di colonie. Dopo incubazione a 41,5 \pm 1°C per 44 \pm 4 ore in microaerofilia vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e calcolato l'indice di produttività. Nel caso tale indice sia superiore a 0,7 i risultati sono giudicati conformi.

La produttività del terreno è valutata inoltre con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *S. pyogenes* ATCC 19615, *S. pyogenes* ATCC 12384, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *S. agalactiae* ATCC 12386, *S. agalactiae* d'isolamento clinico, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h ore si osservano le caratteristiche emolitiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano emolisi tipiche e buone crescite.

12 - LIMITI DEL METODO

- La crescita ed il tipo di emolisi sul terreno qui descritto dipende 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, non cresce *Haemophilus influenzae*, che richiede sia il fattore X che il fattore V,¹⁰ 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.
- A causa della presenza di carboidrati (amido) le zone di beta emolisi possono essere circondate da un piccolo alone più scuro, apparentemente di alfa emolisi.
- Per isolare e riconoscere i patogeni contenuti nel campione, seminare il materiale in esame anche su appropriati terreni selettivi e sull'agar cioccolato.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche, morfologiche ed emolitiche, 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.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso specifiche per i prodotti 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 tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Ellner PD, Stoessel CJ, Drakeford E, Vasi, F. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Path* 1966; 45: 502-504.
2. Atlas D, Snyder J. Media Reagents and Stains. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015. p.345.
3. MacFaddin JF. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. ISO 10272-1, 10272-2: 2017. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 1:detection, part 2:enumeration*
5. 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.
6. 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.
7. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
8. 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.
9. CLSI (formerly NCCLS) *Quality Control of Commercially Prepared Culture Media*. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
10. 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 chocolated blood bgar 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	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

