

**ISTRUZIONI PER L'USO****BLOOD AGAR SHEEP****Piastre pronte all'uso**

Blood Agar Sheep:
colonie di Streptococco beta emolitico di gruppo A

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale, non selettivo, con sangue defibrinato di montone 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 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Digerito pancreatico di caseina	15,0 g
Peptone di soia	5,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Agar	15,0 g
Sangue defibrinato di montone	50,0 ml
Acqua purificata	1000,0 ml

*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. Le piastre di Blood Agar Sheep Biolife sono preparate con Tryptic Soy Agar addizionato del 5% di sangue defibrinato di montone.

Blood Agar Sheep è un terreno d'uso generale, arricchito, per la crescita di microrganismi esigenti e non e per la differenziazione batterica sulla base delle loro caratteristiche emolitiche.

Blood Agar Sheep è preparato con un peptone di caseina ed un peptone di soia selezionati per ottenere emolisi ottimali; essi forniscono azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno. La presenza del sangue defibrinato di montone permette una preliminare differenziazione batterica sulla base del tipo di emolisi espressa.

Sulle piastre di Blood Agar Sheep 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 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	rosso-sangue, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,3 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Blood Agar Sheep	Piastre pronte all'uso	541151	2 x 10 piastre ø 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 Blood Agar Sheep 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 Le piastre di Blood Agar Sheep non sono indicate 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 (GLP) per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.³

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 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: seminare con uno striscio al centro della piastra un ceppo emolitico di *S. aureus* (ATCC 33862). 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.

9 - 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 Blood Agar Sheep 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 complete 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 Blood Agar Sheep.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 monocytogenes* 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 fra lo striscio di crescita del ceppo in esame e con lo striscio di crescita dello *Staphylococcus aureus* ATCC 33862

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.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, diffusa β -emolisi
<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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Blood Agar Sheep e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Tryptic Soy Agar REF 402150) 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. 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.

Il CAMP test è effettuato con il ceppo di *S. aureus* ATCC 33862 e con *S. agalactiae* ATCC 12386 e *S. pyogenes* 19615. Dopo incubazione in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 h si osserva la caratteristica intensificazione a freccia della zona emolitica del ceppo *S. agalactiae*.

12 - LIMITI DEL METODO

- 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, 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.
- 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. Buxton T. Blood agar plates and hemolysis protocols. ASM Science, 2005
2. Robert M, Ritchie J. 1903. Manual of Bacteriology. The MacMillan Company, London, 1903.
3. 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.
4. 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.
5. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
6. 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.
7. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
8. 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	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 5	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

