

**ISTRUZIONI PER L'USO****TODD HEWITT CNA BROTH**

Terreno di coltura pronto per l'uso in provetta

Todd Hewitt CNA Broth – da sinistra:
provetta non inocolata, *S. agalactiae***1 - DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno per l'arricchimento selettivo degli Streptococchi di Gruppo B (*S. agalactiae*), da campioni clinici.**2 - FORMULA TIPICA ***

Infuso di cuore di manzo estratto da	500,0 g
Peptoni	20,0 g
Glucosio	2,0 g
Sodio cloruro	2,0 g
Sodio carbonato	2,0 g
Sodio fosfato bibasico	0,4 g
Estratto di lievito	10,0 g
Colistina	10 mg
Acido nalidissico	15 mg
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

Gli Streptococchi di Gruppo B (SGB) o *Streptococcus agalactiae* sono cocci Gram positivi, anaerobi facoltativi, ossidasi negativi, catalasi negativi, che causano una malattia invasiva neonatale che si manifesta con una forma precoce (entro sette giorni dalla nascita, ma soprattutto entro le prime 24 ore di vita), caratterizzata da sepsi, polmonite, distress respiratorio.¹ L'infezione è trasmessa da mamme colonizzate dal batterio al neonato per via verticale attraverso il canale del parto. Nei Paesi europei e negli Stati Uniti l'incidenza della malattia è intorno allo 0,5-1 per mille nati vivi.^{1,2}

Todd Hewitt CNA Broth, noto anche come Lim Broth, è preparato sulla base di una modificazione della formulazione di Lim e coll.^{3,4} che hanno proposto un brodo arricchito selettivo e il test di co-agglutinazione su vetrino per effettuare lo screening rapido di tali pazienti.

Almeno nel 50% delle donne portatrici di SGB si hanno falsi negativi se la coltura è eseguita seminando i campioni direttamente in agar piuttosto che eseguendo un passaggio preliminare in brodo di arricchimento.⁵ L'uso del brodo Todd Hewitt con colistina e acido nalidissico, seguito dall'isolamento su piastra, è raccomandato per massimizzare le probabilità di recupero degli SGB.⁵⁻⁷

Todd Hewitt CNA Broth, possiede un'elevata concentrazione di peptoni che favorisce un'eccellente crescita microbica e impedisce la formazione di proteasi; il glucosio stimola la produzione di emolisina; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico; il sodio carbonato ed il sodio fosfato bibasico neutralizzano l'acidità che si forma durante la crescita microbica e la fermentazione del glucosio. La colistina e l'acido nalidissico inibiscono i batteri Gram negativi, favorendo la crescita dal campione degli streptococchi.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in provetta	terreno limpido di colore giallo
pH finale a 25 °C	7,8 ± 0,2

5 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Todd Hewitt CNA Broth	Terreno pronto in provetta	552134B	20 provette di vetro da 9 mL, 17x125 mm, con fondo piatto e tappo a vite, in scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, anse da microbiologia, materiali per l'incubazione in condizioni controllate, reagenti e terreni di coltura accessori.

7 - CAMPIONI

Todd Hewitt CNA Broth può essere inoculato con tamponi materni basso-vaginali e anorettali; il tampone alto-vaginale ha una bassa sensibilità.⁶ È possibile raccogliere il campione vaginale e rettale utilizzando un unico tampone o due diversi tamponi.⁷ I campioni devono essere trasportati e processati il prima possibile; se la semina fosse ritardata, è preferibile la refrigerazione alla conservazione a temperatura ambiente. Gli Streptococchi di Gruppo B possono rimanere vitali nei terreni di trasporto (Amies o Stuart con o senza carbone) per diversi giorni a temperatura ambiente, tuttavia, il recupero diminuisce nell'arco di 1-4 giorni, specialmente a temperature elevate, il che può portare falsi negativi.^{6,7}

Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare il terreno in provetta direttamente con il campione raccolto con tampone. Spremere il tampone sulla superficie di vetro per scaricare completamente il campione nel terreno.

Incubare a 35-37°C per 18-24 ore in atmosfera aerobica o arricchita al 5% CO₂.⁵⁻⁷

Dopo incubazione eseguire un ri-trapianto su piastre di idoneo terreno (Blood Agar e/o Columbia CNA Blood Agar e/o Chromogenic Strep B Agar). Prestazioni ottimali si hanno con l'impiego di più di un terreno d'isolamento.⁶





9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la crescita microbica è indicata dalla torbidità che si sviluppa nelle provette inoculate.

Dopo un'incubazione overnight delle piastre verificare la presenza di possibili colonie di Streptococco di Gruppo B; in caso di assenza di crescita, re-incubare nuovamente per 24 ore prima di riportare il risultato come negativo. Sull'agar sangue, le colonie tipiche di Streptococco di Gruppo B sono grigie, traslucide, con una zona circostante di beta-emolisi (l'assenza di emolisi è molto rara).⁶

Eseguire l'identificazione sierologica sulle colonie mediante test di agglutinazione al lattice con un antisiero di Gruppo B.

10 - CONTROLLO QUALITÀ

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 ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>S.agalactiae</i>	ATCC 12386	35-37°C / 16-24H / A o CO ₂	buona crescita
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	35-37°C / 16-24H / A o CO ₂	nessuna crescita

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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di provette pronte all'uso di Todd Hewitt CNA Broth viene testato per la produttività e la selettività. La produttività è valutata inoculando meno di 100 UFC/provetta dei ceppi-target *S.agalactiae* ATCC 12386 e *S.agalactiae* ATCC 13813 ed incubando a 35-37°C per 16-24 ore in aerobiosi: dopo incubazione si osserva la formazione di una buona torbidità.

La selettività è valutata inoculando più di 1000 UFC/provetta del ceppo non-target *E.coli* ATCC 25922 e incubando a 35-37°C per 16-24 ore in aerobiosi: dopo incubazione non si osserva alcuno sviluppo di torbidità.

12 - LIMITI DEL METODO

- Le percentuali di isolamento di SGB da campioni clinici dipendono da diversi fattori; è stato dimostrato che il rilevamento della colonizzazione da SGB può essere migliorata prestando attenzione alla tempistica della coltura, ai siti di raccolta del campione e al metodo microbiologico utilizzato per la coltura.⁶
- Dopo l'arricchimento in Todd Hewitt CNA Broth, anche se le colonie microbiche sulle piastre di isolamento sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sui ceppi isolati in coltura pura, per una loro completa identificazione. Se pertinente, eseguire test di sensibilità antimicrobica.
- Il terreno 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 dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

13 - 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.
- 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.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- Fare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- La singola provetta del prodotto qui descritto è monouso. Non suddividere il prodotto in altri contenitori.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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.

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. Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

- Società Italiana di Neonatologia Prevenzione della malattia perinatale da streptococco di gruppo B [2010]
- Istituto Superiore di Sanità. Infezioni neonatali precoci e tardive da streptococco di gruppo B in Italia [2011]
- Lim DV, Kanarek KS, Peterson ME. Magnitude of colonization and sepsis by group B streptococci in newborn infants. *Curr Microbiol* 1982;7:99-101.
- Jones DE, Friedl EM, Kanarek KS, Williams JK, Lim DV. Rapid identification of pregnant women heavily colonized with group B streptococci. *J Clin Microbiol.* 1983;18(3):558-60.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *Recommendations and Reports*, November 19, 2010 / 59(RR10);1-32.





6. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): Detection of Carriage of Group B Streptococci· (Streptococcus agalactiae) B58, 2018
7. Spellenberg B, Brandt B, Sendi P. Streptococcus. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology,12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta

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
Revisione 5	Aggiornamenti e correzioni nei capitoli 2, 3, 4, 7, 8, 12, 13, 14	03/2021
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

