

**ISTRUZIONI PER L'USO****COLUMBIA AGAR BASE****Terreno di coltura in polvere**Columbia Blood Agar:
Group A β -haemolytic *Streptococcus***1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale, non selettivo, da utilizzare con sangue defibrinato animale 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 (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)***

Peptocomplex	10 g
Triptosio	10 g
Peptone	3 g
Amido di mais	1 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	12 g

*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 Agar Base è un terreno d'uso generale, non selettivo, da impiegare addizionato di sangue defibrinato di montone o cavallo 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 Agar Base con il 5% di sangue defibrinato di montone 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

Columbia Agar Base con il 5-10% (v/v) di sangue di cavallo o di montone, con il supplemento di crescita per *Campylobacter* ed una adatta miscela antimicrobica viene utilizzato per la preparazione dei terreni per l'isolamento di *Campylobacter* spp.: terreno di Skirrow,⁵ terreno di Blaser Wang⁶.

Columbia Agar Base con sangue di montone, cavallo o umano ed una specifica miscela antimicrobica, è utilizzato per l'isolamento di *Gardnerella* vaginale.^{7,8}

Columbia Agar Base con l'aggiunta del 5% di sangue animale defibrinato e il supplemento colistina ed acido nalidissico è utilizzato per l'isolamento dei cocci gram-positivi.¹

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. L'aggiunta di sangue defibrinato di montone permette una preliminare differenziazione batterica sulla base del tipo di emolisi espressa.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 41 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed il 5-7% di sangue defibrinato sterile di montone o cavallo, mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

Columbia Agar Base può essere impiegato anche per la preparazione dei seguenti terreni:

Agar sangue Columbia CNA: aggiungere il 5% di sangue defibrinato sterile di montone o cavallo e il contenuto di una fiala di CNA Antimicrobic Supplement (REF 4240018); mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

Terreno Campylobacter Skirrow: a 500 mL di terreno di base sterilizzato e pre-raffreddato, aggiungere 50 mL di sangue defibrinato di montone o 25 mL di sangue di lisato cavallo, il contenuto di una fiala di *Campylobacter* Growth Supplement (REF 4240021) ed il contenuto di una fiala di Skirrow Antimicrobic Supplement (REF 4240016); mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

Gardnerella vaginalis agar: a 500 mL di terreno di base sterilizzato e pre-raffreddato, aggiungere 25 mL di sangue umano, di pecora o di cavallo e il contenuto di una fiala di *Gardnerella* Selective Supplement (REF 4240019); mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, paglierino

Aspetto del terreno in soluzione

paglierino, leggermente opalescente

Aspetto del terreno in piastra (con sangue)

rosso-sangue, opaco

pH finale a 20-25 °C

7,3 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Columbia Agar Base	Terreno in polvere	4011362	500 g (12.2L)
		4011364	5 kg (122 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, materiali per la generazione di un'atmosfera di incubazione controllata, sangue animale, arricchimenti e supplementi selettivi, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Le piastre preparate con Columbia Agar Base 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.¹⁰⁻¹² Le piastre preparate





con Columbia Agar Base 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.¹⁰ Per l'esame microbiologico degli alimenti fare riferimento alla norma ISO citata⁴.

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 un'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.

10 - 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 Agar Base addizionato con il 5% di sangue defibrinato di montone.¹³

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

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

11 - 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 di Columbia Agar Base addizionato con il 5% di sangue defibrinato di montone.¹⁴

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 Columbia Agar Base addizionato con il 5% 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 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.

13 - LIMITI DEL METODO

- La crescita ed il tipo di emolisi su Columbia Agar Base addizionato con il 5% di sangue defibrinato di montone 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 agar sangue Columbia, 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.

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.
- 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra o in provetta o in flacone.
- 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 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.
- 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 preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi), dei supplementi addizionati e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Ellner PD, Stoessel CJ, Drakeford E, Vasi, F. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Path* 1966; 45: 502-504.
- 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.
- MacFaddin JF. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- 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.
- Skirrow MB. *Campylobacter Enteritis: A "New" Disease*. *Br Med J* 1977 2(6078):9-11.
- Blaser MJ, Berkowitz ID, LaForce FM, Cravens J, Reller LB, Wang WLL. *Campylobacter enteritis: clinical and epidemiological features*. *Ann Intern Med*. 1979; 91:179-185.
- Elek SD. The plate virulence test for Diphtheria. *J Clin Pathol* 1949; 2:250
- Ison, CA, Dawson SG, Hilton J, Csonka GW, Easmon CSF. Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of Gardnerella vaginalis infection. *J. Clin. Pathol* 1982; 35:550
- Catlin BV. Gardnerella vaginalis: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:213
- 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	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 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 4	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	01/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

