

88-1028-1

Revised: July 1999

TRANSLINGUA

BBL™ Medium Supplement for the Selection of Pathogenic *Neisseria*ENG – 6.5 pt on 7.5 pt leading
MLL – 6 pt on 7 pt leading

V-C-N Inhibitor	Ten vials, lyophilized; each reconstitutes to 2 mL	Cat. No. 212227
	Ten vials, lyophilized; each reconstitutes to 10 mL	212228
V-C-N-T Inhibitor	Ten vials, lyophilized; each reconstitutes to 10 mL	212408

English:	pages	1 – 3	Italiano:	pagine	6 – 8
Français :	pages	3 – 5	Español:	páginas	8 – 10
Deutsch:	Seiten	5 – 6			

INTENDED USE – V-C-N Inhibitor is an antibiotic mixture of vancomycin, colistin and nystatin which is incorporated into culture media to permit selective isolation of *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis*.

V-C-N-T Inhibitor contains the same antibiotic mixture as V-C-N Inhibitor with the addition of trimethoprim to improve recovery of pathogenic *Neisseria* by increasing selectivity of isolation media.

SUMMARY AND EXPLANATION – Media containing V-C-N Inhibitor, e.g., Thayer-Martin Selective Agar,¹ are used for isolation of pathogenic *Neisseria* from the throat, vagina, rectum or urethra.¹⁻³ Not only is the overgrowth of gonococci and meningococci by contaminants minimized, but the “saphrophytic” *Neisseria* species are almost completely suppressed.

Martin et al. modified Thayer-Martin Selective Agar by adding trimethoprim to produce Transgrow Medium in bottles with a carbon dioxide-enriched atmosphere and Modified Thayer-Martin Agar in plates.^{4,5} A significantly greater number of positive gonococcal isolates from clinical specimens was reported as compared with Thayer-Martin Selective Agar due to the inhibition of swarming *Proteus* species.⁵⁻⁷ Because of its improved performance, it is recommended over earlier formulations for the isolation of *N. gonorrhoeae*.⁸⁻¹⁰

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE – V-C-N Inhibitor contains vancomycin to inhibit gram-positive contaminants, colistin to inhibit gram-negative bacteria, including *Pseudomonas* species, and nystatin to suppress the growth of yeasts.

V-C-N-T Inhibitor contains the same antibiotic mixture as V-C-N Inhibitor with the addition of trimethoprim, which inhibits *Proteus* species.

REAGENTS

Approximate Formula* per 1 mL Reconstituted Solution:

V-C-N Inhibitor: Vancomycin.....	300 µg	V-C-N-T Inhibitor: Vancomycin	300 µg
Colistin	750 µg	Colistin	750 µg
Nystatin	1250 units	Nystatin	1250 units
		Trimethoprim Lactate ..	500 µg

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Precautions: For Laboratory Use.

V-C-N Inhibitor and V-C-N-T Inhibitor are for use in culture media and not for use in human or animal therapy. Observe aseptic techniques in the reconstitution and addition of these media supplements. Read “Instructions.”

This product contains dry natural rubber.

Storage Instructions and Reconstitution: On receipt, store at -20 to +8°C. After reconstitution, use immediately or store below -20°C and use within two weeks. Avoid repeated freezing and thawing.

Using a sterile syringe and needle, reconstitute each lyophilized vial by aseptically adding the following volumes of sterile purified water: 212227 – 2 mL; 212228 and 212408 – 10 mL.

The expiration date applies to the lyophilized product, stored as directed.

Product Deterioration: Examine reconstituted reagents at the time of use for evidence of contamination, evaporation, or other signs of deterioration.

PROCEDURE

Material Provided: Depending upon which product is ordered, one of the medium supplements listed above is provided.

Materials Not Provided: Ancillary culture media, reagents, quality control organisms and laboratory equipment as required for this procedure.

Instructions: Preparation of Thayer-Martin Agar —

1. Prepare a double-strength base by suspending 7.2 g of **BBL™** GC Agar Base or GC II Agar Base in 100 mL of purified water, using a 500 mL flask. Mix thoroughly, heat with frequent agitation and boil for about 1 min to assure complete solution of ingredients.
2. Suspend 2 g of **BBL** Hemoglobin Powder in 100 mL purified water to make a 2% solution. (Mix 2 g of Hemoglobin Powder with 2 to 3 mL purified water until a smooth paste is achieved. Gradually add the balance of the water until the solution is homogeneous. If larger volumes are required, use the same method, maintaining the same ratio of Hemoglobin to purified water.) Alternatively, use **BBL** Hemoglobin Solution 2% warmed to approximately 50°C.
3. Sterilize the GC Agar Base or GC II Agar Base and Hemoglobin solution, if prepared from the powder, by autoclaving at 121°C for 15 min.
4. Cool the sterile solutions to approximately 50°C.
5. Reconstitute **BBL™ IsoVitaleX™** Enrichment, 2 mL (see insert for directions).
6. To reconstitute V-C-N Inhibitor, see “Storage Instructions and Reconstitution.”
7. Aseptically add the 100 mL of Hemoglobin, 2 mL of **IsoVitaleX** Enrichment, 2 mL of V-C-N Inhibitor to the 100 mL of sterile cooled GC Agar Base or GC II Agar Base.
8. Mix gently but thoroughly and distribute into sterile Petri dishes or other sterile containers.

**BECTON
DICKINSON**Size: 5" W x 10.25" L
Color: Standard Black
Draft: 9/5/95

The V-C-N Inhibitor, 10 mL, is used similarly, by adding the reconstituted contents of one vial to 500 mL of sterile cooled GC Agar Base or GC II Agar Base (36.0 g of the base in 500 mL purified water to make a double-strength base), 500 mL of sterile 2% Hemoglobin solution (approximately 50°C), and 10 mL of **IsoVitalex** Enrichment.

Preparation of Modified Thayer-Martin Agar and Transgrow Medium with Trimethoprim:

1. For preparation of Transgrow Medium, add extra agar to GC Agar Base or GC II Agar Base to bring the final agar concentration to 2% and sterilize by autoclaving at 121°C for 15 min.
2. After mixing the sterile, cooled (approximately 50°C) GC Agar Base or GC II Agar Base, sterile and cooled Hemoglobin Solution, **IsoVitalex** Enrichment and V-C-N-T Inhibitor, add 6 mL of sterile 25% dextrose solution to each liter of medium.*
3. Aseptically dispense into Petri dishes (Modified Thayer-Martin Agar) or (for preparation of Transgrow Medium with Trimethoprim) into horizontally positioned sterile 1 oz. prescription bottles (8- to 10-mL volumes) and loosely apply rubber-lined screw caps.
4. After the medium has cooled and solidified in the bottles, introduce a carbon dioxide atmosphere into the bottles by placing a group of bottles in a vacuum chamber, exhaust the air with a vacuum pump (15 lb negative pressure) and refill the chamber with a filtered mixture of 10% CO₂ – 90% air until the chamber is at 5 lb positive pressure; repeat this step three times. After the third gassing, leave the chamber at positive pressure for 2 to 3 h before returning it to atmospheric pressure.
5. Upon opening the chamber, tighten screw caps to make an airtight seal.

* In the **BBL** formulation for Modified Thayer-Martin Agar the extra dextrose has been eliminated for improved growth of *N. gonorrhoeae*.

User Quality Control – Examine lyophilized and reconstituted supplement for signs of deterioration as noted under "Product Deterioration." Check performance of the finished medium by inoculation with pure cultures of stable control organisms, producing known, desired reactions. The following cultures are recommended:

Thayer-Martin Agar

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , ATCC® 43069	Growth
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 12228	Inhibition (partial)

Modified Thayer-Martin Agar and Transgrow Medium with Trimethoprim

In addition to the cultures listed above:

<i>Proteus mirabilis</i> , ATCC 43071	Inhibition (partial)
---------------------------------------	----------------------

RESULTS

Typical colonial morphology on these media is as follows:

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Small, grayish-white to colorless, mucoid
<i>Neisseria meningitidis</i>	Medium to large, blue-gray, mucoid

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE – Media into which V-C-N Inhibitor and V-C-N-T Inhibitor are incorporated are selective media that may inhibit other pathogenic bacteria, e.g., *Haemophilus*. Also, the existence of strains of *N. gonorrhoeae* inhibited by vancomycin and trimethoprim lactate have been reported.^{11,12} It is suggested that Chocolate Agar and blood agar plates be used in conjunction with selective media to aid in the isolation of other pathogens that may be present in the specimen.

Nystatin has been reported to be relatively ineffective in inhibiting the growth of yeast contaminants at the recommended concentration.¹³ Gonococci may be inhibited in the presence of *Candida albicans*.^{14,15}

While "saprophytic" *Neisseria* are generally suppressed by selective media, the occasional recovery of *N. lactamica* on Thayer-Martin Selective Agar has been reported.¹⁶

Some strains of *Capnocytophaga* species may grow on these selective media when inoculated with oropharyngeal specimens.¹⁷

Since there is no such entity as a perfect medium, some strains of microorganisms are encountered that grow poorly on a particular medium; the nature of the specimens or samples themselves and the physiologic state of the organisms on isolation can influence recovery of desired species, as well as modify the effects of inhibitory characteristics of a selective medium for undesired species.

It should be noted that situations are relatively rare when a single medium will suffice both for detection and for enumeration of specific microorganisms. Each selective medium represents a compromise in that selective agents, while being inhibitory to many undesired species, may also be somewhat inhibitory to specific strains of the desired species for which the medium was designed.

Appropriate texts should be consulted for further information.^{17,18}

REFERENCES

1. Thayer, J.D., and J.E. Martin, Jr. 1966. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Public Health Rep. 81:559-562.
2. Mitchell, M.S., D.L. Rhoden, and B.B. Marcus. 1966. Immunofluorescence techniques for demonstrating bacterial pathogens associated with cerebrospinal meningitis. III. Identification of meningococci from the nasopharynx of asymptomatic carriers. Am. J. Epidem. 83:74-85.
3. Martin, J.E., T.E. Billings, J.F. Hackney, and J.D. Thayer. 1967. Primary isolation of *N. gonorrhoeae* with a new commercial medium. Public Health Rep. 82:361-363.
4. Martin, J.E., Jr., and A. Lester. 1971. Transgrow, a medium for transport and growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. HSMHA Health Rep. 86:30-33.
5. Martin, J.E., J.H. Armstrong, and P.B. Smith. 1974. New system for cultivation of *Neisseria gonorrhoeae*. Appl. Microb. 27:802-805.
6. Center for Disease Control. January 2, 1975. Memorandum: recommendation to use the same medium, Modified Thayer-Martin (MTM), in both plates and bottles for the GC culture screening program. U.S. Public Health Service, Atlanta.
7. Seth, A. 1970. Use of trimethoprim to prevent overgrowth by *Proteus* in the cultivation of *N. gonorrhoeae*. Br. J. Vener. Dis. 46:201-202.
8. Center for Disease Control. 1975. Criteria and techniques for the diagnosis of gonorrhoeae. U.S. Public Health Service, Atlanta.
9. Evangelista, A.T., and H.R. Beilstein. 1993. Cumitech 4A, Laboratory diagnosis of gonorrhoeae, Coord. ed., C. Abramson. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

10. Morello, J.A., W.M. Janda, and G.V. Doern. 1991. *Neisseria* and *Branhamella*, p. 258-276. In A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Cross, R.C., M.B. Hoger, R. Neibaur, B. Pasternack, and F.J. Brady. 1971. VCN-inhibited strains of *Neisseria gonorrhoeae*. HSMHA Health Rep. 86:990-992.
12. Phillips, I., D. Humphrey, A. Middleton, and C.S. Nicol. 1972. Diagnosis of gonorrhoeae by culture on a selective medium containing vancomycin, colistin, nystatin, and trimethoprim (VCNT). A comparison with Gram-staining and immunofluorescence. Br. J. Vener. Dis. 48:287-292.
13. Faur, Y.C., M.H. Weisburd, and M.E. Wilson. 1973. A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC Medium). II. Effect of amphotericin B and trimethoprim lactate on selectivity. Health Lab. Sci. 10:55-60.
14. Hipp, S.S., W.D. Lawton, N.C. Chen, and H.A. Gaafar. 1974. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by a factor produced by *Candida albicans*. Appl. Microbiol. 27:192-196.
15. Hipp, S.S., W.D. Lawton, M. Savage, and H.A. Gaafar. 1975. Selective interaction of *Neisseria gonorrhoeae* and *Candida albicans* and its possible role in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 1:476-477.
16. Edberg, S.C. 1974. The growth of *Neisseria lactamica* on media selective for pathogenic *Neisseriaceae*. Am. J. Clin. Pathol. 62:445.
17. Baron, E.J., and S.M. Finegold. 1990. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 8th ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis.
18. Balows, A., W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy. 1991. Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

TECHNICAL INFORMATION: In the United States telephone Technical Services, toll free (800) 638-8663.

© 1999 Becton Dickinson and Company

BBL and IsoVitalX are trademarks of Becton Dickinson and Company.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson Microbiology Systems

Becton Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA



Becton Dickinson France S.A.

11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

MADE
IN
U.S.A.

88-1028-1
Révisé : 07-99

FRANÇAIS

Supplément de milieu BBL pour la sélection de *Neisseria* pathogène

Inhibiteur V-C-N	Dix flacons, lyophilisés ; un flacon reconstitué donne 2 mL	N° cat. 21227
	Dix flacons, lyophilisés ; un flacon reconstitué donne 10 mL	21228
Inhibiteur V-C-N-T	Dix flacons, lyophilisés ; un flacon reconstitué donne 10 mL	212408

APPLICATION – L'inhibiteur V-C-N est un mélange antibiotique composé de vancomycine, de colistine et de nystatine, lequel est incorporé aux milieux de culture afin de permettre l'isolement sélectif de *Neisseria gonorrhoeae* et de *N. meningitidis*.

L'inhibiteur V-C-N-T contient le même mélange antibiotique que l'inhibiteur V-C-N mais contient en outre du triméthoprime qui permet d'améliorer la mise en évidence de *Neisseria* pathogène en augmentant la sélectivité du milieu d'isolement.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION – Les milieux contenant l'inhibiteur V-C-N, telle la gélose sélective Thayer-Martin,¹ sont utilisés pour l'isolement de *Neisseria* pathogène de la gorge, du vagin, du rectum ou de l'urètre.¹⁻³ L'inhibiteur permet non seulement de réduire au minimum la pullulation de gonocoques et de méningocoques par contaminants mais de presque complètement inhiber la croissance des espèces "saprophytes" de *Neisseria*.

Martin et al. ont modifié la gélose sélective Thayer-Martin par addition de triméthoprime pour produire le milieu Transgrow utilisé en flacons sous atmosphère enrichie en dioxyde de carbone ainsi que la gélose modifiée Thayer-Martin utilisée en boîtes.^{4,5} Il a été rapporté avec ces milieux un nombre sensiblement plus élevé de mises en évidence de gonocoques à partir d'échantillons cliniques qu'avec la gélose sélective Thayer-Martin grâce à l'inhibition d'espèces de *Proteus* envahissantes.⁵⁻⁷ Du fait de sa meilleure performance, cette formule est recommandée par rapport aux formules plus anciennes pour l'isolement de *N. gonorrhoeae*.⁸⁻¹⁰

PRINCIPES DE LA METHODE – L'inhibiteur V-C-N contient de la vancomycine pour inhiber les contaminants gram-positifs, de la colistine pour inhiber les bactéries gram-négatives, y compris les espèces de *Pseudomonas*, et de la nystatine pour inhiber la croissance de levures.

L'inhibiteur V-C-N-T contient le même mélange antibiotique que l'inhibiteur V-C-N avec l'addition de triméthoprime qui inhibe les espèces de *Proteus*.

REACTIFS

Formule approximative* par 1 mL de solution reconstituée :

Inhibiteur V-C-N : Vancomycine	300 µg	Inhibiteur V-C-N-T : Vancomycine	300 µg
Colistine	750 µg	Colistine	750 µg
Nystatine	1250 unités	Nystatine	1250 unités
		Lactate de triméthoprime	500 µg

*Ajustée et/ou supplémentée en fonction des critères de performance imposés

Précautions : usage en laboratoire.

Les inhibiteurs V-C-N et V-C-N-T sont destinés à être additionnés à des milieux de culture et non à être utilisés en thérapie humaine ou animale. Se conformer aux techniques aseptiques durant la reconstitution et l'addition de ces milieux de supplément. Lire "Instructions".

Ce produit contient du caoutchouc naturel séché.

Instructions pour la conservation et la reconstitution : dès réception, conserver entre -20 et +8 °C. Utiliser immédiatement après reconstitution ou conserver à une température inférieure à -20 °C et utiliser dans un délai de deux semaines. Eviter de congeler et décongeler à plusieurs reprises.

Reconstituer chaque flacon lyophilisé à l'aide d'une seringue stérile munie d'une aiguille en ajoutant de manière aseptique les volumes suivants d'eau purifiée stérile : 212227 – 2 mL ; 212228 et 212408 – 10 mL.

La date de péremption s'applique au produit lyophilisé, conservé tel que prescrit.

Détérioration du produit : examiner les réactifs reconstitués au moment de l'utilisation afin de détecter toute évidence de contamination, d'évaporation ou autres signes de détérioration.

METHODE

Matériel fourni : selon le produit commandé, un des milieux de supplément mentionnés ci-dessus est fourni.

Matériel non-fourni : les milieux de culture auxiliaires, les réactifs, les organismes pour le contrôle de qualité et l'équipement de laboratoire nécessaire pour cette procédure.

Instructions : préparation de la gélose Thayer-Martin —

1. Préparer une base de double concentration dans un flacon de 500 mL en mettant en suspension 7,2 g de gélose de base GC **BBL** ou de gélose de base GC II dans 100 mL d'eau purifiée. Mélanger rigoureusement, chauffer en agitant fréquemment et faire bouillir pendant environ 1 min, afin d'assurer une dissolution complète des ingrédients.
2. Mettre en suspension 2 g de poudre d'hémoglobine **BBL** dans 100 mL d'eau purifiée pour obtenir une solution à 2 %. (Mélanger 2 g de poudre d'hémoglobine dans 2 à 3 mL d'eau purifiée jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Ajouter graduellement le reste de l'eau en s'assurant que la solution reste homogène. Si de plus larges volumes sont nécessaires, utiliser la même méthode en gardant les mêmes proportions d'hémoglobine et d'eau purifiée.) Alternativement, utiliser la solution d'hémoglobine **BBL** à 2 %, chauffée à environ 50 °C.
3. Stériliser la gélose de base GC ou la gélose de base GC II et la solution d'hémoglobine, si celle-ci a été préparée à partir de poudre, à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
4. Refroidir les solutions stériles jusqu'à environ 50 °C.
5. Reconstituer l'enrichissement **IsoVitaleX BBL** afin d'obtenir un volume final de 2 mL (voir les instructions dans la notice).
6. Pour reconstituer l'inhibiteur V-C-N, voir "Instructions pour la conservation et la reconstitution".
7. Ajouter de manière aseptique 100 mL d'hémoglobine, 2 mL d'enrichissement **IsoVitaleX** et 2 mL d'inhibiteur V-C-N aux 100 mL de gélose de base GC ou de gélose de base GC II stériles et refroidies.
8. Mélanger doucement mais rigoureusement et distribuer dans des boîtes de Pétri stériles ou autres récipients stériles.

L'inhibiteur V-C-N, 10 mL, est utilisé de façon analogue en ajoutant le contenu reconstitué d'un flacon à 500 mL de gélose de base GC ou de gélose de base GC II stériles et refroidies (36,0 g de base dans 500 mL d'eau purifiée pour obtenir une base de concentration double), 500 mL de solution stérile d'hémoglobine à 2 % (à environ 50 °C) et 10 mL d'enrichissement **IsoVitaleX**.

Préparation de la gélose Thayer-Martin modifiée et du milieu Transgrow avec triméthoprime :

1. Pour la préparation du milieu Transgrow, ajouter plus de gélose aux géloses de base GC ou GC II pour obtenir une concentration finale en gélose de 2 % et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
2. Après avoir mélangé la gélose de base GC ou la gélose de base GC II stériles et refroidies (environ 50 °C), la solution d'hémoglobine stérile et refroidie, l'enrichissement **IsoVitaleX** et l'inhibiteur V-C-N-T, ajouter 6 mL de solution de dextrose à 25 % par litre de milieu.*
3. Dispenser de manière aseptique dans des boîtes de Pétri (gélose Thayer-Martin modifiée) ou (pour la préparation du milieu Transgrow avec triméthoprime) dans des flacons stériles de 1 oz (8 à 10 mL) en position horizontale et visser sans serrer les bouchons doublés de caoutchouc.
4. Après que le milieu se soit refroidi et solidifié dans les flacons, y introduire une atmosphère de dioxyde de carbone en plaçant, dans un premier temps, les flacons dans une chambre à vide pour extraire l'air avec une pompe (6,8 kg de pression négative), puis, dans un deuxième temps, en remplissant la chambre avec un mélange filtré de 10 % CO₂ et 90 % d'air jusqu'à ce que la chambre soit à 2,3 kg de pression positive. Répéter la dernière étape trois fois. Après la troisième introduction de mélange gazeux filtré, laisser la chambre sous pression positive pendant 2 ou 3 heures avant de la remettre à pression atmosphérique.
5. Immédiatement après avoir ouvert la chambre, bien serrer les bouchons pour rendre les flacons hermétiques.

* Dans la formule **BBL** pour la gélose Thayer-Martin modifiée le dextrose supplémentaire a été éliminé pour améliorer la croissance de *N. gonorrhoeae*.

Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur – Examiner le supplément lyophilisé et reconstitué pour tout signe de détérioration comme indiqué dans la rubrique "Détérioration du produit". Vérifier la performance du milieu complet en inoculant des cultures pures d'organismes de contrôle stables produisant des réactions connues et désirées. Les cultures suivantes sont recommandées :

Gélose Thayer-Martin

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , ATCC 43069	Croissance
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 12228	Inhibition (partielle)

Gélose Thayer-Martin modifiée et milieu Transgrow avec triméthoprime

En supplément aux cultures déjà mentionnées ci-dessus :

<i>Proteus mirabilis</i> , ATCC 43071	Inhibition (partielle)
---------------------------------------	------------------------

RESULTATS

La morphologie typique des colonies sur ces milieux est comme suit :

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Petites, gris-blanc à incolores, mucoïdes
<i>Neisseria meningitidis</i>	Moyennes ou grandes, bleu-gris, mucoïdes

LIMITES DE LA METHODE – Les milieux dans lesquels les inhibiteurs V-C-N et V-C-N-T sont incorporés sont des milieux sélectifs qui peuvent inhiber d'autres bactéries pathogènes telles l'*Haemophilus*. De plus, l'existence de souches de *N. gonorrhoeae* inhibées par la vancomycine et le lactate de triméthoprime a été rapportée.^{11,12} Il est suggéré d'utiliser des boîtes de gélose chocolat et de gélose au sang en conjonction avec les milieux sélectifs pour faciliter l'isolement d'autres pathogènes possiblement présents dans les échantillons.

Il a été rapporté que la nystatine était relativement inefficace pour inhiber la croissance de levures contaminantes à la concentration recommandée.¹³ Les gonocoques peuvent être inhibés en présence de *Candida albicans*.^{14,15}

Alors que les bactéries *Neisseria* "saprophytes" sont généralement inhibées en milieux sélectifs, la mise en évidence occasionnelle de *N. lactamica* sur la gélose sélective Thayer-Martin a été rapporté.¹⁶

Certaines souches des espèces *Capnocytophaga* peuvent croître sur ces milieux sélectifs quand elles sont inocuées à partir d'échantillons oropharyngiens.¹⁷

Puisqu'il n'existe pas de milieu parfait, on rencontrera des souches de microorganismes à croissance faible dans un milieu particulier ; la nature des échantillons et l'état physiologique des organismes au moment de l'isolement peut influencer la mise en évidence des espèces recherchées ainsi que modifier les effets des caractéristiques d'inhibition d'un milieu sélectif pour les espèces indésirables.

Il faut noter que les cas sont rares où un seul milieu suffira pour, à la fois, détecter et énumérer des microorganismes spécifiques. Chaque milieu sélectif représente un compromis dans la mesure où les agents sélectifs, quoiqu'inhibant de nombreuses espèces indésirables, peuvent avoir également un effet quelque peu inhibiteur pour certaines souches des espèces recherchées pour lesquelles le milieu a été conçu.

Il faudra consulter les textes appropriés pour obtenir plus d'informations.^{17,18}

BIBLIOGRAPHIE : voir la rubrique "References" du texte anglais.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

88-1028-1
Revidiert: 07-99

DEUTSCH

BBL Mediumsupplement zur Selektion von pathogenen *Neisseria*

V-C-N Hemmer	Zehn Fläschchen, lyophilisiert; jedes Fläschchen wird auf 2 mL rekonstituiert	Best.-Nr. 212227
	Zehn Fläschchen, lyophilisiert; jedes Fläschchen wird auf 10 mL rekonstituiert	212228
V-C-N-T Hemmer	Zehn Fläschchen, lyophilisiert; jedes Fläschchen wird auf 10 mL rekonstituiert	212408

VERWENDUNGSZWECK – V-C-N Hemmer ist eine Mischung der Antibiotika Vancomycin, Colistin und Nystatin, die Kulturmedien zur selektiven Isolierung von *Neisseria gonorrhoeae* und *N. meningitidis* zugesetzt wird.

V-C-N-T Hemmer enthält neben der Antibiotikamischung des V-C-N Hemmers zusätzlich Trimethoprim, um durch eine erhöhte Selektivität der Isolierungsmedien die Isolierung von pathogenen *Neisseria* zu verbessern.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG – V-C-N Hemmer enthaltende Medien, z.B. Thayer-Martin-Selektivagar,¹ werden zur Isolierung von pathogenen *Neisseria* aus Rachen, Vagina, Rektum oder Urethra verwendet.¹⁻³ Hierdurch wird nicht nur ein Überwachsen der Gonokokken und Meningokokken durch kontaminierende Keime minimiert, sondern es werden auch "saprophytische" *Neisseria*-Spezies fast vollständig unterdrückt.

Durch Zugabe von Trimethoprim haben Martin et al. den Thayer-Martin-Selektivagar modifiziert und produzierten so das in Flaschen mit Kohlendioxid angereicherter Atmosphäre erhältliche Transgrow-Medium und den als Platte erhältlichen modifizierten Thayer-Martin-Agar.^{4,5} Beim Vergleich mit dem Thayer-Martin-Selektivagar wurde hierbei eine beträchtlich größere Zahl positiver Gonokokken-Isolate aus klinischen Proben festgestellt. Dies beruht auf der Hemmung schwärmender *Proteus*-Spezies.⁵⁻⁷ Aufgrund seiner verbesserten Leistung wird das von Martin u.a. modifizierte Medium anstelle von früheren Formeln zur Isolierung von *N. gonorrhoeae* empfohlen.⁸⁻¹⁰

VERFAHRENSPRINZIP – V-C-N Hemmer enthält Vancomycin zur Hemmung grampositiver kontaminierender Keime, Colistin zur Hemmung gramnegativer Bakterien (einschließlich *Pseudomonas*-Spezies) und Nystatin zur Unterdrückung von Hefenwachstum.

V-C-N-T Hemmer enthält die gleiche Antibiotikamischung wie V-C-N Hemmer sowie Trimethoprim, das *Proteus*-Spezies hemmt.

REAGENZIEN

Ungefähre Zusammensetzung* pro 1 mL rekonstituierte Lösung:

V-C-N Hemmer:	Vancomycin	300 µg	V-C-N-T Hemmer:	Vancomycin	300 µg
	Colistin	750 µg		Colistin	750 µg
	Nystatin	1250 Einheiten		Nystatin	1250 Einheiten
				Trimethoprimlactat ...	500 µg

*Abgestimmt und/oder supplementiert auf die geforderten Testkriterien.

Sicherheitshinweise: Nur für den Laborgebrauch.

V-C-N Hemmer und V-C-N-T Hemmer sind nur zur Anwendung in Kulturmedien und nicht für den therapeutischen Einsatz bei Menschen oder Tieren bestimmt. Bei der Rekonstitution und Anwendung dieses Mediensupplements sollten die Grundsätze aseptischer Arbeitsweise eingehalten werden. Bitte die "Anleitungen" lesen.

Dieses Produkt enthält trockenen Naturkautschuk.

Aufbewahrung und Rekonstitution: Nach Erhalt bei -20 bis +8 °C lagern. Nach der Rekonstitution sofort verwenden oder bei mindestens -20 °C lagern und innerhalb von zwei Wochen verwenden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

Unter Verwendung einer sterilen Spritze und Kanüle jedes lyophilisierte Fläschchen rekonstituieren, indem aseptisch die folgenden Volumina destilliertes Wasser zugegeben werden: 212227 – 2 mL; 212228 und 212408 – 10 mL.

Das angegebene Verfallsdatum gilt nur für das lyophilisierte Produkt und bei vorschriftsmäßiger Lagerung.

Produktverfall: Rekonstituierte Reagenzien zum Zeitpunkt der Anwendung auf Anzeichen von Kontamination, Evaporation oder sonstige Anzeichen von Produktverfall untersuchen.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Je nach bestelltem Produkt wird eines der oben aufgeführten Mediensupplements mitgeliefert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und die Laborgeräte, die für dieses Verfahren benötigt werden.

Anleitungen : Zubereitung des Thayer-Martin-Agars —

1. Eine Basis von doppelter Konzentration herstellen, indem in einem 500-mL-Kolben 7,2 g **BBL GC Basalagar** oder **GC II Basalagar** in 100 mL destilliertem Wasser suspendiert werden. Gut durchmischen, unter wiederholtem Schütteln erhitzen und ca. 1 min kochen, um vollständige Lösung aller Substanzen sicherzustellen.
2. 2 g **BBL Hämoglobin-Pulver** in 100 mL destilliertem Wasser suspendieren, um eine 2%ige Lösung herzustellen. (2 g Hämoglobin-Pulver mit 2 bis 3 mL destilliertem Wasser mischen, bis eine glatte Paste vorliegt. Allmählich das restliche Wasser zugeben, bis die Lösung homogen ist. Werden größere Mengen benötigt, dieselbe Methode und dasselbe Verhältnis von Hämoglobin zu destilliertem Wasser verwenden.) Als Alternative kann 2%ige, auf ca. 50 °C erwärmte **BBL Hämoglobinlösung** verwendet werden.
3. Sowohl den GC Basalagar oder GC II Basalagar, als auch die Hämoglobinlösung, falls letztere aus Pulver hergestellt wurde, 15 min lang bei 121 °C im Autoklaven sterilisieren.
4. Die sterilen Lösungen auf ca. 50 °C abkühlen.
5. 2 mL **BBL IsoVitaleX** Anreicherung rekonstituieren (siehe Anweisungen in der Packungsbeilage).

6. Zur Rekonstitution von V-C-N Hemmer siehe "Aufbewahrung und Rekonstitution".
7. Den 100 mL des sterilen, abgekühlten GC Basalagars oder GC II Basalagars werden aseptisch 100 mL Hämoglobin, 2 mL **IsoVitaleX** Anreicherung und 2 mL V-C-N Hemmer zugesetzt.
8. Vorsichtig aber gut durchmischen und in sterile Petrischalen oder andere sterile Gefäße geben.

Die 10 mL des V-C-N Hemmers werden in ähnlicher Weise verwendet, indem der rekonstituierte Inhalt eines Fläschchens zu 500 mL sterilem, abgekühltem GC Basalagar oder GC II Basalagar (36,0 g Basis in 500 mL destilliertem Wasser lösen, um eine Basis von doppelter Konzentration herzustellen), 500 mL steriler, 2%iger Hämoglobininlösung (von ca. 50 °C) und 10 mL **IsoVitaleX** Anreicherung zugegeben wird.

Zubereitung des modifizierten Thayer-Martin-Agars und Transgrow-Mediums mit Trimethoprim:

1. Zur Zubereitung des Transgrow-Mediums zusätzlichen Agar zum GC Basalagar oder GC II Basalagar zusetzen, um die Endkonzentration des Agars auf 2% einzustellen. Danach 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisieren.
2. Nach dem Mischen des sterilen, abgekühlten (ca. 50 °C) GC Basalagars oder GC II Basalagars, der sterilen und abgekühlten Hämoglobininlösung, der **IsoVitaleX** Anreicherung und des V-C-N-T Hemmers, 6 mL sterile, 25%ige Dextroselösung zu jeweils einem Liter Medium geben.*
3. Aseptisch auf Petrischalen (modifizierter Thayer-Martin-Agar) oder (zur Herstellung von Transgrow-Medium mit Trimethoprim) auf flach liegende, sterile Medizinfläschchen von 8 bis 10 mL Inhalt verteilen. Die Fläschchen werden mit Gummi-Schraubverschlüssen lose verschlossen.
4. Nach dem Abkühlen und Verfestigen des Mediums wird in den Flaschen eine Kohlendioxid-Atmosphäre hergestellt, indem mehrere Flaschen in eine Vakuumkammer gebracht werden, danach die Luft mit einer Vakuumpumpe (6,8 kg negativer Druck) abgesaugt und die Kammer mit einer Mischung aus gefiltertem Kohlendioxid (10 %) und gefilterter Luft (90 %) gefüllt wird, bis in der Kammer ein Überdruck von 2,3 kg vorhanden ist. Diesen Schritt dreimal wiederholen. Nach der dritten Gasfüllung 2 bis 3 Stunden lang einen Überdruck in der Kammer aufrechterhalten, bevor der Druck in der Kammer auf Atmosphärendruck gesenkt wird.
5. Nach dem Öffnen der Kammer die Schraubverschlüsse luftdicht festdrehen.

* In der **BBL** Formel für den modifizierten Thayer-Martin-Agar wurde die zusätzliche Dextrose eliminiert, um das Wachstum von *N. gonorrhoeae* zu verbessern.

Qualitätskontrolle durch den Anwender – Das lyophilisierte und rekonstituierte Supplement wie unter "Produktverfall" beschrieben auf Anzeichen von Verfall überprüfen. Die Leistungsprüfung des fertigen Mediums durch Inokulation mit Reinkulturen stabiler Kontrollorganismen durchführen, wobei bekannte, gewünschte Reaktionen auftreten sollten. Folgende Testkulturen werden empfohlen:

Thayer-Martin-Agar

Neisseria gonorrhoeae, ATCC 43069

Wachstum

Staphylococcus epidermidis, ATCC 12228

(teilweise) gehemmtes Wachstum

Modifizierter Thayer-Martin-Agar und Transgrow-Medium mit Trimethoprim
Zusätzlich zu den oben erwähnten Kulturen:

Proteus mirabilis, ATCC 43071

(teilweise) gehemmtes Wachstum

ERGEBNISSE

Die typische Morphologie der Kulturen auf diesen Medien ist folgendermaßen:

Neisseria gonorrhoeae

Klein, grau-weiß bis farblos, mukös

Neisseria meningitidis

Mittel bis groß, blau-grau, mukös

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN – Medien, denen V-C-N Hemmer und V-C-N-T Hemmer zugesetzt wurden, sind selektive Medien, die andere pathogene Bakterien wie z.B. *Haemophilus* hemmen können. In der Literatur wird auch über Stämme von *N. gonorrhoeae* berichtet, die durch Vancomycin und Trimethoprimlactat gehemmt werden.^{11,12} Es wird empfohlen, Schokoladenagar und Blutagarplatten in Verbindung mit selektiven Medien zu verwenden, um die Isolierung anderer, eventuell in der Probe vorhandener pathogener Keime zu unterstützen.

Es wird berichtet, daß Nystatin bei der empfohlenen Konzentration eine relativ ineffektive Wachstumshemmung von kontaminierenden Hefen zeigt.¹³ Gonokokken werden u.U. durch die Anwesenheit von *Candida albicans* gehemmt.^{14,15}

Während "saprophytische" *Neisseria* normalerweise durch selektive Medien unterdrückt werden, wurde über die gelegentliche Isolierung von *N. lactamica* auf selektivem Thayer-Martin-Agar berichtet.¹⁶

Einige Stämme von *Capnocytophaga*-Spezies können auf diesen selektiven Medien wachsen, wenn das Inokulat aus Proben vom Oropharynx stammt.¹⁷

Da es ein perfektes Medium nicht gibt, trifft man auf Mikroorganismen, die auf einem bestimmten Medium schlecht wachsen. Der Zustand der Abstriche oder Proben selber und der physiologische Zustand der Organismen bei der Isolierung können die Isolierung der gewünschten Spezies beeinflussen und auch die Hemmwirkungsmerkmale eines selektiven Mediums für unerwünschte Spezies modifizieren.

Es muß erwähnt werden, daß ein einziges Medium nur selten sowohl zum Nachweis wie auch zur Auszählung spezifischer Mikroorganismen ausreicht. Jedes selektive Medium ist insoweit ein Kompromiß, als daß selektive Substanzen, die viele unerwünschte Spezies hemmen können, u.U. auch eine geringe Hemmung von spezifischen Stämmen der gewünschten Spezies, für die das Medium entwickelt wurde, zeigen können.

Für weitere Informationen hierzu wird auf die Literatur verwiesen.^{17,18}

LITERATURNACHWEIS: S. "References" im englischen Text.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

88-1028-1
Rivisto: 07-99

ITALIANO

Supplemento al terreno BBL per la ricerca di *Neisseria* patogena

Inibente V-C-N	Dieci flaconi, liofilizzati; ricostituiti da 2 mL l'uno	N° di cat. 212227
	Dieci flaconi, liofilizzati; ricostituiti da 10 mL l'uno	212228
Inibente V-C-N-T	Dieci flaconi, liofilizzati; ricostituiti da 10 mL l'uno	212408

USO PREVISTO – L'inibente V-C-N è una miscela antibiotica di vancomicina, colistina e nistatina che viene aggiunta ai terreni di coltura per l'isolamento selettivo di *Neisseria gonorrhoeae* e *N. meningitidis*.

L'inibente V-C-N-T contiene la stessa miscela antibiotica dell'inibente V-C-N, con l'aggiunta di trimethoprim per migliorare il recupero dei ceppi patogeni di *Neisseria* aumentando la selettività dei terreni di isolamento.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE – I terreni contenenti l'inibente V-C-N, come l'agar selettivo Thayer-Martin,¹ sono usati per isolare i ceppi patogeni di *Neisseria* da faringe, vagina, retto o uretra.¹⁻³ Non solo viene minimizzata la crescita dei contaminanti che possono "coprire" quella dei gonococchi e meningococchi, ma le specie "saprofitte" *Neisseria* sono quasi completamente inibite.

Martin e coll. hanno modificato l'agar selettivo Thayer-Martin aggiungendo trimethoprim e producendo così il terreno Transgrow in flaconi con un'atmosfera arricchita di anidride carbonica e l'agar Thayer-Martin modificato in piastra.^{4,5} È stato riscontrato un numero notevolmente superiore di isolati gonococchi positivi provenienti da campioni clinici, rispetto all'agar selettivo Thayer-Martin, a causa dell'inibizione delle specie *Proteus* sciamanti.⁵⁻⁷ Vista la sua migliore performance, lo si raccomanda per l'isolamento di *N. gonorrhoeae*.⁸⁻¹⁰

PRINCIPI DELLA PROCEDURA – La miscela V-C-N contiene vancomicina che inibisce i contaminanti gram-positivi, colistina che inibisce i batteri gram-negativi, fra cui le specie *Pseudomonas*, e nistatina per sopprimere la crescita dei lieviti.

L'inibente V-C-N-T contiene la stessa miscela antibiotica dell'inibente V-C-N, con l'aggiunta di trimethoprim che inibisce le specie *Proteus*.

REAGENTI

Formula approssimata* per 1 mL di soluzione ricostituita:

Inibente V-C-N: Vancomicina.....	300 µg	Inibente V-C-N-T: Vancomicina.....	300 µg
Colistina.....	750 µg	Colistina.....	750 µg
Nistatina.....	1250 unità	Nistatina.....	1250 unità
		Lattato di trimethoprim.....	500 µg

*Controllata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

Precauzioni: Per uso di laboratorio.

Le miscele V-C-N e V-C-N-T sono previste per l'uso con terreni di coltura e non su animali o esseri umani a scopo terapeutico. Seguire tecniche asettiche nella ricostituzione e nell'aggiunta di questi supplementi. Leggere le "Istruzioni".

Questo prodotto contiene gomma naturale allo stato secco.

Istruzioni per la conservazione e la ricostituzione: Al ricevimento conservare da -20 a +8° C. Usare immediatamente dopo la ricostituzione o conservare a temperature inferiori a -20° C e usare entro due settimane. Non scongelare e ricongelare ripetutamente.

Ricostituire in sterilità ogni flacone liofilizzato aggiungendo i seguenti volumi di acqua purificata sterile: 212227 – 2 mL; 212228 e 212408 – 10 mL.

La data di scadenza vale per il prodotto liofilizzato, conservato secondo le istruzioni.

Deterioramento del prodotto: Esaminare al momento dell'uso i reagenti ricostituiti per verificare che non vi siano tracce di contaminazione, evaporazione o altri segni di deterioramento.

PROCEDURA

Materiale fornito: A seconda del prodotto ordinato, viene fornito uno dei supplementi per terreni elencati qui sopra.

Materiali non forniti: Terreni di coltura ausiliari, reagenti, organismi di controllo qualità e le apparecchiature di laboratorio necessarie per questo procedimento.

Istruzioni: Preparazione del terreno Thayer-Martin —

- Preparare una base a doppia concentrazione sciogliendo 7,2 g di base agar GC **BBL** o base agar GC II in 100 mL di acqua purificata, usando un matraccio da 500 mL. Mescolare accuratamente, riscaldare agitando frequentemente e bollire per circa 1 min onde garantire il completo scioglimento di tutti gli ingredienti.
- Sciogliere 2 g di polvere di emoglobina **BBL** in 100 mL di acqua purificata per ottenere una soluzione al 2%. (Mescolare 2 g di polvere di emoglobina con 2 – 3 mL di acqua purificata fino ad ottenere una pasta uniforme. Aggiungere gradatamente il resto dell'acqua fino a quando la soluzione non sia omogenea. Se sono necessari volumi maggiori, usare lo stesso metodo, mantenendo lo stesso rapporto di emoglobina/acqua purificata.) Altrimenti, usare la soluzione di emoglobina **BBL** al 2% riscaldata a circa 50° C.
- Sterilizzare la base agar GC o la base agar GC II e la soluzione di emoglobina, se preparata dalla polvere, in autoclave a 121° C per 15 minuti.
- Raffreddare le soluzioni a circa 50° C.
- Ricostituire il supplemento **IsoVitaleX BBL**, 2 mL (seguire le istruzioni sul foglietto illustrativo).
- Per ricostituire la miscela V-C-N, vedere "Istruzioni per la conservazione e la ricostituzione".
- Aggiungere in sterilità 100 mL di emoglobina, 2 mL di supplemento **IsoVitaleX**, 2 mL di miscela V-C-N a 100 mL di base agar GC o base agar GC II sterile raffreddata.
- Mescolare gentilmente ma accuratamente e distribuire su piastre Petri o altri contenitori sterili.

La miscela V-C-N, 10 mL viene usata in modo simile, aggiungendo il contenuto ricostituito di un flacone a 500 mL di base agar GC o base agar GC II sterile raffreddata (36,0 g di base in 500 mL di acqua purificata per ottenere una base a doppia concentrazione), 500 mL di soluzione di emoglobina sterile al 2% (circa 50° C) e 10 mL di supplemento **IsoVitaleX**.

Preparazione del terreno Thayer-Martin modificato e del terreno Transgrow con trimethoprim:

- Per preparare il terreno Transgrow, aggiungere altro agar alla base GC o alla base GC II per portare la concentrazione finale di agar al 2% e sterilizzare in autoclave a 121° C per 15 minuti.
- Dopo aver mescolato la base GC o la base GC II sterile raffreddata (circa 50° C), la soluzione di emoglobina sterile raffreddata, il supplemento **IsoVitaleX** e la miscela V-C-N-T, aggiungere 6 mL di soluzione di destrosio sterile al 25% ad ogni litro di terreno.*
- Distribuire sterilmente su piastre Petri (agar Thayer-Martin modificato) o (per la preparazione del terreno Transgrow con trimethoprim) in provette sterili da 1 oncia (8 – 10 mL di volume) poste orizzontalmente e con i tappi parzialmente svitati.
- Una volta che il terreno si sia raffreddato e solidificato, introdurre un'atmosfera di anidride carbonica, collocando un gruppo di provette in una camera pre-vuoto e facendo uscire l'aria con una pompa a vuoto (pressione negativa di 6,8 kg), per poi riempire la camera con una miscela filtrata di 10% CO₂ – 90% aria fino a quando la camera non raggiunga una pressione positiva di 2,3 kg; ripetere tre volte. Dopo la terza volta, lasciare la camera alla pressione positiva per 2 – 3 ore prima di riportarla a quella atmosferica.
- Dopo aver aperto la camera, stringere i tappi a vite in modo da chiudere ermeticamente le provette.

* Nella formulazione **BBL** per l'agar Thayer-Martin modificato è stato eliminato il destrosio addizionale per migliorare la crescita di *N. gonorrhoeae*.

Controllo di qualità per l'utente – Esaminare il supplemento liofilizzato e ricostituito per verificare che non vi siano segni di deterioramento descritti nella sezione "Deterioramento del prodotto". Controllare la performance del terreno preparato inoculandolo con colture pure di organismi di controllo che diano reazioni note. Si raccomandano le seguenti colture:

Agar Thayer-Martin

Neisseria gonorrhoeae, ATCC 43069

Crescita

Staphylococcus epidermidis, ATCC 12228

Inibizione (parziale)

Agar Thayer-Martin modificato e terreno Transgrow con Trimethoprim

Oltre alle colture sopra elencate:

Proteus mirabilis, ATCC 43071

Inibizione (parziale)

RISULTATI

La morfologia tipica delle colonie su questi terreni è la seguente:

Neisseria gonorrhoeae

Colonie piccole, bianco-grigie o incolori, mucoidi

Neisseria meningitidis

Colonie medio-larghe, grigio-blu, mucoidi

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA – I terreni in cui sono incorporati gli antibiotici V-C-N e V-C-N-T sono terreni selettivi che possono inibire altri batteri patogeni, ad esempio *Haemophilus*. Inoltre, è stata rilevata l'esistenza di ceppi di *N. gonorrhoeae* inibiti da vancomicina e trimethoprim lattato.^{11,12} Si suggerisce di usare piastre di agar cioccolato e agar sangue insieme ai terreni selettivi, come ausilio nell'isolamento di altri patogeni che possono essere presenti nel campione.

La nistatina è risultata relativamente inefficace nell'inibizione della crescita di contaminanti quali i lieviti alla concentrazione raccomandata.¹³ I gonococchi possono essere inibiti in presenza di *Candida albicans*.^{14,15}

Le specie "saprofiti" *Neisseria* sono in genere inibite nei terreni selettivi; è stata tuttavia notata l'occasionale crescita di *N. lactamica* su agar Thayer-Martin.¹⁶

Alcuni ceppi delle specie *Capnocytophaga* possono crescere su questi terreni selettivi se sono presenti nei campioni faringei.¹⁷

Un terreno ideale non esiste; alcuni microrganismi possono crescere male su un terreno particolare, la natura stessa dei campioni e lo stato fisiologico del ceppo batterico su cui si sta eseguendo l'isolamento possono influire sul recupero della specie voluta e modificare l'effetto delle caratteristiche inibenti di un terreno selettivo su specie non desiderate.

Si deve tenere presente che solo in casi rari un terreno singolo basterà sia per il rilevamento che per la conta di specifici microrganismi. Ogni terreno selettivo rappresenta un compromesso in quanto gli agenti selettivi da un lato inibiranno molte specie indesiderate, ma d'altro canto possono inibire in qualche misura ceppi specifici delle specie desiderate per cui il terreno è previsto.

Consultare i relativi testi per ulteriori informazioni.^{17,18}

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

88-1028-1

Revisado: 07-99

ESPAÑOL

Suplemento para medios BBL para la selección de *Neisseria* patógena

Inhibidor V-C-N	Diez frascos liofilizados; cada uno se reconstituye a un volumen de 2 mL	Nº de cat. 212227
	Diez frascos liofilizados; cada uno se reconstituye a un volumen de 10 mL	212228
Inhibidor V-C-N-T	Diez frascos liofilizados; cada uno se reconstituye a un volumen de 10 mL	212408

USO PREVISTO – El inhibidor V-C-N es una mezcla antibiótica de vancomicina, colistina y nistatina la cual se incorpora a medios de cultivo para permitir el aislamiento selectivo de *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

El inhibidor V-C-N-T contiene la misma mezcla antibiótica que el inhibidor V-C-N pero agrega el antibiótico trimetoprima. De esta forma se incrementa la selectividad de los medios de aislamiento mejorando la recuperación de *Neisseria* patógena.

RESUMEN Y EXPLICACION – Los medios que contienen el inhibidor V-C-N, como por ejemplo, el agar selectivo Thayer-Martin¹, se utilizan para el aislamiento de *Neisseria* patógena de garganta, vagina, recto o uretra.¹⁻³ De esta forma no sólo se minimiza el sobrecrecimiento de gonococos y meningococos por contaminantes, sino que también se suprime en forma casi completa a las especies "saprofitas" de *Neisseria*.

Martin y otros modificaron el agar selectivo Thayer-Martin mediante la adición de trimetoprima para producir en frascos el medio Transgrow con una atmósfera enriquecida de dióxido de carbono y en placas el agar Thayer-Martin modificado.^{4,5} Se dio a conocer un número significativamente mayor de aislados gonococales positivos a partir de muestras clínicas en comparación con los obtenidos en el agar selectivo Thayer-Martin. Esto se debe a la inhibición de las abundantes especies *Proteus*.⁵⁻⁷ Debido a su mejorado rendimiento, se recomienda utilizar este agar modificado en lugar de las formulaciones anteriores para el aislamiento de *N. gonorrhoeae*.⁸⁻¹⁰

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO – El inhibidor V-C-N contiene vancomicina para inhibir contaminantes grampositivos, colistina para inhibir bacterias gramnegativas, incluyendo las especies de *Pseudomonas*, y nistatina para suprimir el crecimiento de levaduras.

El inhibidor V-C-N-T contiene la misma mezcla antibiótica que el inhibidor V-C-N con la adición de trimetoprima que inhibe las especies *Proteus*.

REACTIVOS

Fórmula aproximada* por 1 mL de solución reconstituida:

Inhibidor V-C-N: Vancomicina.....	300 µg	Inhibidor V-C-N-T: Vancomicina.....	300 µg
Colistina.....	750 µg	Colistina.....	750 µg
Nistatina.....	1250 unidades	Nistatina.....	1250 unidades
		Lactato de trimetoprima....	500 µg

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Precauciones: Para uso de laboratorio.

Los inhibidores V-C-N y V-C-N-T están destinados para el uso en medios de cultivo y no para utilizarse en tratamientos de humanos o animales. Observe las técnicas asépticas durante la reconstitución y la adición de estos suplementos a los medios. Lea las "Instrucciones".

Este producto contiene goma natural seca.

Instrucciones para el almacenamiento y la reconstitución: Al recibir el producto, almacénelo entre -20 y +8° C. Después de reconstituirlo, úselo inmediatamente o almacénelo a una temperatura inferior a -20° C y utilícelo dentro de dos semanas. Evite congelar y descongelar repetidamente.

Utilizando una jeringa y aguja estériles, reconstituya cada frasco liofilizado agregando asépticamente los siguientes volúmenes de agua purificada estéril: N° de cat. 212227 – 2 mL; N° de cat. 212228 y 212408 – 10 mL.

La fecha de caducidad se aplica al producto liofilizado almacenado en la forma indicada.

Deterioro del producto: Examine los reactivos reconstituidos al momento de usarlos en busca de indicios de contaminación, evaporación o cualquier otro signo de deterioro.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: Dependiendo del producto ordenado, se provee uno de los suplementos para medio de cultivo indicados anteriormente.

Materiales no suministrados: Medios de cultivo auxiliares, reactivos, organismos para el control de calidad y equipo de laboratorio que se requiera para este procedimiento.

Instrucciones: Preparación del agar Thayer-Martin —

1. Prepare una base doblemente concentrada mediante la suspensión de 7,2 g de agar base GC **BBL** o agar base GC II en 100 mL de agua purificada, utilizando un matraz de 500 mL. Mezcle bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto aproximadamente para asegurar una disolución completa.
2. Suspenda 2 g de hemoglobina en polvo **BBL** en 100 mL de agua purificada para obtener una solución al 2%. (Mezcle 2 g de hemoglobina en polvo con 2 a 3 mL de agua purificada hasta obtener una pasta suave. Lleve la solución a un volumen de 100 mL agregando el agua purificada en forma gradual hasta que la solución sea homogénea. En caso de requerirse volúmenes mayores, utilice el mismo método, manteniendo las mismas proporciones de hemoglobina y agua purificada). Como alternativa, use una solución de hemoglobina **BBL** al 2% calentada a aproximadamente 50° C.
3. Esterilice el agar base GC o el GC II y la solución de hemoglobina, si ésta fue preparada a partir del polvo. Para ello, autoclave a 121° C durante 15 minutos.
4. Enfríe las soluciones estériles a aproximadamente 50° C.
5. Reconstituya el enriquecimiento **IsoVitaleX BBL** a 2 mL (vea las instrucciones en el prospecto).
6. Para reconstituir el inhibidor V-C-N, vea las "Instrucciones para el almacenamiento y la reconstitución".
7. Agregue asépticamente los 100 mL de hemoglobina, 2 mL de enriquecimiento **IsoVitaleX** y 2 mL de inhibidor V-C-N a los 100 mL del agar base GC o GC II estéril y enfriado.
8. Mezcle suavemente pero en forma completa y distribuya sobre placas de Petri estériles u otros envases estériles.

El inhibidor V-C-N reconstituido a 10 mL se utiliza de modo similar, agregando los contenidos reconstituidos de un frasco a 500 mL de agar base GC o GC II estéril y enfriado (36,0 g de la base en 500 mL de agua purificada para obtener una base de concentración doble), 500 mL de una solución de hemoglobina estéril al 2% (aproximadamente a 50° C) y 10 mL de enriquecimiento **IsoVitaleX**.

Preparación del agar Thayer-Martin modificado y del medio Transgrow con trimetoprima:

1. Para preparar el medio Transgrow, agregue una cantidad extra de agar al agar base GC o GC II para llevar la concentración final del agar a un 2% y esterilice con autoclave a 121° C durante 15 minutos.
2. Después de mezclar el agar base GC o GC II estéril y enfriado (a aproximadamente 50° C), la solución de hemoglobina estéril y enfriada, el enriquecimiento **IsoVitaleX** y el inhibidor V-C-N-T, agregue 6 mL de una solución estéril de dextrosa al 25% a cada litro de medio.*
3. Asépticamente, distribuya el agar Thayer-Martin modificado en placas de Petri o el medio Transgrow con trimetoprima en frascos de prescripción estériles de 1 onza (8 a 10 mL de volumen) colocados en posición horizontal y luego ponga las tapas de rosca de goma sin ajustarlas.
4. Después de que el medio se haya enfriado y solidificado en los frascos, introduzca una atmósfera de dióxido de carbono en los frascos, colocando un grupo de frascos en una cámara de vacío y extrayendo el aire con una bomba de vacío (6,8 kg de presión negativa) y rellene la cámara con una mezcla filtrada de 10% de CO₂ y 90% de aire hasta que la cámara se encuentre a una presión positiva de 2,3 kg; repita este procedimiento tres veces. Después de la tercera vez, deje la cámara a una presión positiva durante 2 a 3 horas antes de retornarla a la presión atmosférica.
5. Al abrir la cámara, ajuste las tapas de rosca de los frascos para sellar la entrada de aire.

* En la formulación **BBL** para el agar Thayer-Martin modificado, el exceso de dextrosa ha sido eliminado para mejorar el crecimiento de *N. gonorrhoeae*.

Control de calidad por parte del usuario – Examine el suplemento liofilizado y reconstituido en busca de indicios de deterioro como se describe en la sección "Deterioro del producto". Evalúe el rendimiento del medio final mediante la inoculación con cultivos puros de organismos de control estables que produzcan reacciones conocidas y deseadas. Se recomiendan los siguientes cultivos:

Agar Thayer-Martin

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , ATCC 43069	Crecimiento
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 12228	Inhibición (parcial)

Agar Thayer-Martin modificado y medio Transgrow con trimetoprima
Además de los cultivos indicados anteriormente:

<i>Proteus mirabilis</i> , ATCC 43071	Inhibición (parcial)
---------------------------------------	----------------------

RESULTADOS

La morfología típica de las colonias en estos medios se describe a continuación:

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Pequeñas, de blancas grisáceas a incoloras, mucoides.
<i>Neisseria meningitidis</i>	Medianas a grandes, azul grisáceas, mucoides.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO – Los medios a los que se les han incorporado los inhibidores V-C-N y V-C-N-T son medios selectivos que pueden inhibir a otras bacterias patógenas, como por ejemplo, *Haemophilus*. También se ha reportado la existencia de cepas de *N. gonorrhoeae* inhibidas por vancomicina y lactato de trimetoprima.^{11,12} Se recomienda que las placas con agar chocolate y con agar sanguíneo sean utilizadas junto con medios selectivos para colaborar en el aislamiento de otros patógenos que pueden estar presentes en la muestra.

Se ha reportado que la nistatina, a la concentración recomendada, es relativamente inefectiva en la inhibición de contaminantes en las levaduras.¹³ Los gonococos pueden estar inhibidos en presencia de *Candida albicans*.^{14,15}

Mientras que las especies "saprofiticas" de *Neisseria* son generalmente suprimidas por medios selectivos, se ha informado la recuperación ocasional de *N. lactamica* en el agar selectivo Thayer-Martin.¹⁶

Algunas cepas de especies *Capnocytophaga* pueden crecer en estos medios selectivos cuando se inoculan con muestras orofaríngeas.¹⁷

Ya que el medio perfecto no existe, algunas cepas de microorganismos crecen pobremente en un medio en particular; la naturaleza de las muestras o las muestras en sí y el estado fisiológico de los organismos aislados pueden influir en la recuperación de las especies deseadas y a su vez modificar los efectos de las características inhibidoras de un medio selectivo para especies no deseadas.

Debe notarse que las situaciones en que el uso de un solo medio satisfará la detección y la enumeración de microorganismos específicos son relativamente raras. Cada medio selectivo representa un compromiso en el cual los agentes selectivos, mientras son inhibitorios para muchas especies no deseadas, pueden también ser inhibitorios en cierta medida para cepas específicas de especies deseadas para las cuales el medio fue diseñado.

Para mayor información consulte los textos apropiados.^{17,18}

BIBLIOGRAFIA: Ver "References" en el texto en inglés.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

MADE
IN
U.S.A.