

BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood

USO PREVISTO

BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood (agar per *Clostridium difficile* con 7% di sangue di montone) è un terreno selettivo per l'isolamento primario di *Clostridium difficile* da campioni di feci e di altra natura.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

Clostridium difficile è la causa più comune di colite e colite pseudomembranosa (CPM) da terapia antibiotica.¹ Sono state elaborate diverse metodiche per l'isolamento di *C. difficile*.²⁻⁴ Nel 1979, George et al. hanno allestito un terreno denominato CCFA (cicloserina cefoxitin fruttosio agar), privo di sangue, basato su agar al tuorlo d'uovo di McClung e Toabe, con fruttosio al posto del glucosio.⁵ **BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood** è una modifica della formula originaria del CCFA. È stata ridotta sia la concentrazione di peptone, per allinearla a quella di altri terreni usati per *C. difficile*, sia la concentrazione di cicloserina e cefoxitin, perché la formula originaria era troppo inibente.⁶ Il tuorlo d'uovo è stato ommesso perché *C. difficile* è licitinasi e lipasi negativo e il terreno inibisce gran parte degli altri *Clostridium*. Il sangue di montone fornisce sostanze nutritive e consente una buona sporulazione e la rilevazione di una fluorescenza verdastra visibile con luce UV a onda lunga.^{7,5}

Il peptone e il fruttosio forniscono l'azoto e il carbonio necessari, i fosfati mantengono il pH, mentre cicloserina e cefoxitin sono agenti selettivi che sopprimono i batteri associati.

REAGENTI

BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood

Formula* per litro di acqua purificata

Digerito peptico di tessuto animale	32,0 g
Fruttosio	6,0
Fosfato monopotassico	1,0
Fosfato disodico	5,0
Cloruro di sodio	2,0
Solfato di magnesio	0,1
Cicloserina	0,5
Cefoxitin	0,016
Agar	20,0
Sangue defibrinato di montone	7%

pH 7,2 ± 0,3

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

PRECAUZIONI

IVD . Solo per uso professionale.

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni di colore, essiccamento, incrinature o altri segni di deterioramento.

Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare le piastre al buio a 2 – 8 °C nella confezione originaria fino a immediatamente prima dell'uso. Evitare il congelamento e il surriscaldamento. Le piastre possono essere inoculate sino alla data di scadenza (v. l'etichetta sulla confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.

Le piastre prelevate dalle confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana se conservate in luogo pulito a 2 – 8 °C.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Inoculare i campioni rappresentativi con i seguenti ceppi (per informazioni più dettagliate, v. **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**). Incubare aerobicamente a 35 – 37 °C per 48 – 72 h.

Ceppi	Risultati della crescita
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	Crescita da buona a eccellente, colonie grigie a scudo, senza emolisi
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Inibizione da parziale a completa, con beta-emolisi
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Inibizione completa
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inibizione completa
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Inibizione completa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inibizione completa
Non inoculate	Rosso (color sangue)

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood (piastre impilate **Stacker** da 90 mm). Microbiologicamente controllate.

Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Prelievo dei campioni e tipi di campioni

Il terreno viene usato per l'isolamento di *C. difficile* da campioni di feci. Usare campioni freschi di feci (possibilmente 10 – 20 mL di feci acquose) di pazienti che si sospetta siano affetti da colite pseudomembranosa (CPM). Difficilmente le analisi di feci solide già formate consentono di formulare la diagnosi di CPM. In particolare, sottoporre ai test per le infezioni da *C. difficile* e CPM i pazienti affetti da sindrome diarroica durante o immediatamente dopo terapia antimicrobica. *Clostridium difficile* è particolarmente sensibile all'ossigeno. I campioni di feci, pertanto, devono essere freschi e trattati entro 2 h se non sono disponibili terreni di trasporto anaerobi (v. anche **PERFORMANCE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**). Se i campioni sono collocati su terreni di trasporto anaerobi, sono consentiti tempi più lunghi, ma comunque inferiori a 24 h. Non congelare i campioni.^{7,8}

Procedura del test

Alla consegna in laboratorio, inoculare quanto prima il campione su **BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood** e strisciare per isolare le colonie. Poiché la crescita di alcuni ceppi di *C. difficile* potrebbero essere condizionata negativamente dalla capacità selettiva del terreno, si consiglia di includere un terreno non selettivo, come **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** o **BD CDC Anaerobe Agar with 5% sheep blood**. Poiché alcuni anaerobi facoltativi possono avere reazioni analoghe al *C. difficile*, si consiglia di incubare una piastra di agar sangue in ambiente aerobico per confermare che l'isolato sia costituito da anaerobi obbligati.

Prima dell'inoculazione, sottoporre a riduzione i terreni anaerobi lasciandoli in ambiente anaerobio per 6 – 24 h prima dell'uso. Per creare in modo semplice e funzionale le condizioni anaerobiche ricercate, utilizzare i sistemi anaerobi **BD GasPak**.

Incubare immediatamente in condizioni anaerobiche a 35 – 37 °C per almeno 48 h.

Indipendentemente dal sistema anaerobico utilizzato, è importante inserire un indicatore di anaerobiosi, come l'indicatore anaerobico monouso **BD GasPak**.

Risultati

Dopo 48 – 72 h di incubazione, *Clostridium difficile* appare sotto forma di colonie banco-grigie simili a vetro smerigliato con bordo lievemente filamentoso, ma senza alcun segno di beta-emolisi. Le colture ben sviluppate hanno un caratteristico odore di "scuderia" causato dall'accumulo di *p*-cresolo. Esaminare la crescita con luce UV a onda lunga per rilevare una fluorescenza verdastra. Eseguire

l'operazione non più di un'ora dopo la rimozione dall'atmosfera anaerobica. Dopo l'esposizione all'aria, le colonie possono perdere rapidamente vitalità, con conseguente perdita di fluorescenza. Sono necessari ulteriori test per confermare l'identificazione degli isolati.⁷⁻¹³

Interpretazione dei risultati

Poiché la presenza in coltura di *Clostridium difficile* senza le tossine A e B del microrganismo non è di per sé indicativa di colite o colite pseudomembranosa da antibiotici, sottoporre il campione di feci ad appropriati test immunologici. I risultati, inoltre, devono essere interpretati alla luce dei riscontri clinici.^{14,15}

PERFORMANCE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Questo terreno su piastra è un preparato standard per l'isolamento primario di *Clostridium difficile*. Alcuni test diagnostici possono essere eseguiti utilizzando la crescita ottenuta per piastratura dal terreno di partenza. Per l'identificazione, è necessario che il microrganismo sia in una coltura pura. Per una conferma definitiva si possono utilizzare colorazione di Gram, morfologia cellulare, sensibilità all'ossigeno, reazioni biochimiche, reattività ad agenti antimicrobici e analisi dei metaboliti mediante cromatografia gas-liquida.

Su questo terreno possono svilupparsi altre specie di *Clostridium*, come *C. ramosum*. Non basarsi esclusivamente sull'isolamento di *Clostridium difficile* per porre la diagnosi eziologica di colite pseudomembranosa (v. anche **Interpretazione dei risultati**).^{14,15}

Non esistono terreni perfetti, per cui alcuni ceppi di *C. difficile* potrebbero crescere con difficoltà su questa base; la natura dei campioni e lo stato fisiologico dei microrganismi possono incidere sull'isolamento delle specie ricercate, modificando le caratteristiche inibenti del terreno.

Clostridium difficile è particolarmente sensibile all'ossigeno. Campioni e terreni di coltura esposti all'aria troppo a lungo perdono vitalità rapidamente.⁸

BIBLIOGRAFIA

1. Bartlett, J.G., et al. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N. Engl. J. Med. 298:531-534.
2. Koransky, J.R., S.D. Allen, and V.R. Dowell, Jr. 1978. Use of ethanol for isolation of spore forming microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 35:762-765.
3. Kafiz, S., and C.L. Oakley. 1976. Clostridium difficile: isolation and characteristics. J. Med. Microbiol. 9:129-137.
4. Willey, S.H., and J.G. Barlett. 1979. Cultures for Clostridium difficile in stools containing a cytotoxin neutralized by Clostridium sordellii antitoxin. J. Clin. Microbiol. 10:880-884.
5. George, W.L., et al. 1979. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 9:214-219.
6. Wüst, J., et al. 1982. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. J. Clin. Microbiol. 9: 214-219.
7. Allen, S.D., and E.J. Baron. 1991. Clostridium. In: Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.J., Isenberg, H.D., and H.J. Shadomy. Manual of Clinical Microbiology, 5th edition. American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA.
8. Onderdonk, A.B., and S.D. Allen. 1995. Clostridium, p. 574-586. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Dowell, V.R., Jr., and T.M. Hawkins. 1987. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC laboratory manual. HHS Publication No. (CDC) 87-8272. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Holdeman, L.V., E.P. Cato, and W.E.C. Moore (ed.). 1977. Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
11. Rodloff, A.C., P.C. Appelbaum, and R.J. Zabransky. 1991. Cumitech 5A, Practical anaerobic bacteriology. Coordinating ed., A.C. Rodloff. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Summanen, P., et al. 1993. Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 5th ed. Star Publishing Co., Belmont, Calif.
13. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
14. George, W.L., R.D. Rolfe, and S.M. Finegold. 1982. Clostridium difficile and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. J. Clin. Microbiol. 15:1049-1053.
15. Baron, E.J. 1989. Assessment of currently available laboratory tests for Clostridium difficile-associated diarrhea. Clin. Microbiol. Newsl. 11:118-120.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood

N. di cat. 254406

Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



BD Diagnostic Systems

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe

Becton Dickinson France SA

11 rue Aristide Bergès

38800 Le Pont de Claix/France

Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD, BD logo, Stacker and GasPak are trademarks of Becton, Dickinson, and Company
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2003 Becton, Dickinson and Company