



e

BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) – Bi-Plate

L007379 • Rev. 12 • giugno 2017

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA) (agar selettivo con sangue di montone al 5% per streptococchi di gruppo A) è un terreno selettivo da usare per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di streptococchi di gruppo A da colture faringee e altri campioni. **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** (**BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5%) è usato per la crescita di microrganismi esigenti e la visualizzazione di reazioni emolitiche. Nel formato a piastra doppia, i settori di terreno TSA II ed **ssA** sono rispettivamente contrassegnati con "I" e "II".

II PROCEDURA DEL TEST

A. **BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood**

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture diluite in modo da ottenere una concentrazione di 10^3 – 10^4 UFC/0,01 mL.
 - a. In ciascuna piastra, dispensare 0,01 mL della diluizione ed eseguire lo striscio per l'isolamento. Penetrare nell'area di striscio primaria prima di eseguire lo striscio sul resto della piastra.
 - b. Porre un disco **BD BBL Taxo A** all'intersezione tra la prima e la seconda area di striscio su tutte le piastre inoculate con ceppi di *S. pyogenes*.
 - c. Incubare le piastre a 35 ± 2 °C in aerobiosi supplementata con anidride carbonica.
 - d. Includere piastre di **BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% (TSA II) come controlli non selettivi per tutti i microrganismi.
2. Esaminare le piastre dopo 18–24 h per verificare la presenza di beta emolisi nell'area penetrata nonché entità di crescita, inibizione, dimensioni delle colonie e reazioni emolitiche. Leggere e registrare le dimensioni della zona intorno al disco **BD BBL Taxo A** con *S. pyogenes*.
3. Risultati attesi

Microrganismi	ATCC	Recupero
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crescita lieve – intesa (a seconda del ceppo e della diluizione) di colonie puntiformi – minute circondate da zone di beta emolisi. Intorno al disco BD BBL Taxo A è chiaramente evidente una zona di inibizione della crescita.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	51574	
<i>Streptococcus mitis</i>	6249	Inibizione parziale
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Inibizione completa
<i>Neisseria subflava</i>	14799	Inibizione completa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Inibizione completa

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

B. **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**

1. Inoculare i campioni rappresentativi con diluizioni delle colture sottoelencate.
 - a. Usando un pipettatore volumetrico o un sistema equivalente, dispensare in ogni piastra 0,01 mL di una diluizione avente una concentrazione di 30–300 UFC e inoculare distribuendo con un apposito diffusore sterile di vetro.
 - b. Incubare i ceppi di stafilococco a 35 ± 2 °C in aerobiosi e i ceppi di streptococco a 35 ± 2 °C in aerobiosi supplementata con anidride carbonica.
2. Esaminare le piastre dopo 18–24 h per verificare crescita, dimensioni delle colonie e reazioni emolitiche.
3. Risultati attesi

Microrganismi di controllo CLSI	ATCC	Recupero
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crescita, beta emolisi
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Crescita, alfa emolisi
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crescita
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Crescita

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le piastre come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle piastre rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $7,4 \pm 0,2$ per entrambi i terreni.
4. Verificare la stabilità delle piastre durante la procedura di inoculo.
5. Incubare a 35 ± 2 °C per 72 h le piastre rappresentative non inoculate ed esaminarle per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA) è raccomandato come terreno selettivo primario in piastra per l'isolamento primario di streptococchi di gruppo A (*S. pyogenes*) da colture faringee e altri campioni in cui si sospetta la presenza di *S. pyogenes*. In questo terreno, crescono anche gli streptococchi di gruppo B, mentre la maggior parte degli altri streptococchi, neisseriae, stafilococchi e batteri gram-negativi sono inibiti. Il terreno è stato concepito per essere usato insieme ai dischi **BD BBL Taxo A** (bacitracina, 0,04 unità) per l'identificazione presuntiva di *S. pyogenes*.

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) è usato per la coltura di microrganismi esigenti e la visualizzazione di reazioni emolitiche sviluppate da numerose specie batteriche.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

L'infezione da streptococchi di gruppo A secondo Lancefield (*S. pyogenes*) può produrre gravi esiti quali febbre reumatica e glomerulonefrite acuta. La rilevazione e identificazione precoci sono pertanto importanti.

Grazie alla composizione nutritiva, **BD BBL Trypticase Soy Agar** è diventato un terreno diffuso, sia in forma non supplementata sia come base per terreni contenenti sangue. **BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% (TSA II) è largamente usato per il recupero e la coltivazione di specie microbiche esigenti e per la determinazione di reazioni emolitiche, importanti ai fini della differenziazione delle caratteristiche dei batteri, in particolare *Streptococcus* spp.

Data la crescita eccessiva della normale flora presente in campioni di colture faringee coltivati su piastre agar sangue di routine, all'agar sangue di montone sono stati aggiunti ingredienti selettivi per migliorare la rilevazione degli streptococchi di gruppo A.

La valutazione di vari antibiotici condotta nei nostri laboratori ha portato alla realizzazione di una combinazione caratterizzata da una selettività migliore di quella di altri terreni selettivi testati. Questo terreno (**ssA**) consente l'identificazione presuntiva degli streptococchi di gruppo A – in base a sensibilità alla bacitracina e beta emolisi – entro 24 h dall'inoculo con il campione, quando il terreno viene incubato in un'atmosfera arricchita di CO₂.¹

Il formato a piastra doppia, contenente l'agar sangue non selettivo (TSA II) nel settore contrassegnato con "I" e l'agar sangue selettivo (**ssA**) in quello contrassegnato con "II," permette il recupero degli streptococchi di gruppo A e la valutazione del microbiota totale del campione con una sola piastra.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La combinazione di caseina e peptoni di soia nella base **BD BBL Trypticase Soy Agar**, rende il terreno altamente nutritivo, fornendo azoto organico. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico.

Il sangue defibrinato di montone assicura le reazioni emolitiche appropriate degli streptococchi. Inoltre, è inibita la crescita di *Haemophilus haemolyticus*, un ceppo non patogeno le cui colonie emolitiche non sono distinguibili da quelle degli streptococchi beta-emolitici.

BD BBL Trypticase Soy Agar con sangue di montone al 5% (TSA II) fornisce eccellente crescita e beta emolisi con *Streptococcus pyogenes* (gruppo A secondo Lancefield), oltre a ottima crescita e reazioni emolitiche appropriate con altri microrganismi esigenti. È adatto all'uso con dischi di bacitracina a bassa concentrazione (0,04 unità) (**BD BBL Taxo A**) per l'identificazione presuntiva di streptococchi di gruppo A (*S. pyogenes*).

BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA) incorpora una combinazione esclusiva di ingredienti selettivi in **BD BBL Trypticase Soy Sheep Blood Agar (TSA II)** per sopprimere la normale flora faringea e migliorare così il recupero di *S. pyogenes*. Il sangue defibrinato di montone fornisce l'arricchimento per la crescita di tali microrganismi esigenti e consente la rilevazione della beta emolisi tipica di *S. pyogenes*. Gli streptococchi beta-emolitici che evidenziano una zona di inibizione intorno al disco di bacitracina (0,04 unità) possono essere presuntivamente identificati come streptococchi di gruppo A.

VII REAGENTI

BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)	BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)
Formula approssimata* per L di acqua purificata	Formula approssimata* per L di acqua purificata
Digerito pancreatico di caseina14,5 g	Digerito pancreatico di caseina14,5 g
Digerito papaico di farina di soia5,0 g	Digerito papaico di farina di soia5,0 g
Cloruro di sodio5,0 g	Cloruro di sodio5,0 g
Agar14,0 g	Agar14,0 g
Fattori di crescita1,5 g	Fattori di crescita1,5 g
Agenti selettivi40,2 mg	Sangue di montone defibrinat5%
Sangue di montone, defibrinato5%	

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

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Se si riscontra un'umidità eccessiva, capovolgere il fondo su un coperchio e lasciare asciugare all'aria per evitare la formazione di aderenze tra la parte superiore e inferiore della piastra durante l'incubazione.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana.

Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle precauzioni standard.²⁻⁵ Dopo l'uso, le piastre preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le piastre al buio a 2–8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. Le piastre preparate, conservate nell'involucro originario a 2–8 °C sino al momento dell'uso, possono essere inoculate fino alla data di scadenza e incubate per i tempi di incubazione raccomandati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto

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

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni faringei idonei per coltura possono essere ottenuti eseguendo un prelievo nell'area faringea o tonsillare con un tampone con punta in poliestere o poliuretano, prestando attenzione a non toccare lingua o uvula. (N.B.: se i tamponi sono usati anche con i test di rilevazione diretta dell'antigene, è necessario usare tamponi in poliuretano, rayon o poliestere su astine di plastica, es. sistemi di raccolta e trasporto **BD BBL CultureSwab** e **BD BBL CultureSwab EZ**.) Campioni raccolti da fonti diverse dalla faringe devono essere posti in coltura in conformità alle procedure raccomandate. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.^{6,7}

IX PROCEDURA

Materiale fornito

BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA) e **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) - Bi-Plate**.

Materiali necessari ma non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test

La superficie agar deve essere omogenea e non eccessivamente umida.

Strisciare il campione non appena perviene in laboratorio. La piastra di striscio è usata principalmente per isolare colture pure da campioni contenenti flora mista. In alternativa, se il materiale viene posto in coltura direttamente da un tampone, far rotolare quest'ultimo su una piccola area della superficie del bordo, quindi strisciare da questa area inocolata. Senza risterilizzare l'ansa, penetrare nell'agar due o tre volte, nelle aree di inoculo più intenso.

Quando si usa questa piastra con lo stesso campione, inoculare prima il lato TSA II, contrassegnato con "I". Inoculare quindi il lato **ssA**, contrassegnato con "II" e coprirlo con un disco **BD BBL Taxo A** posizionandolo sulla parte su cui è passato il tampone, ossia in corrispondenza dell'intersezione di questa parte con l'area di striscio dell'ansa iniziale.

Incubare le piastre inoculate a 35 ± 2 °C in atmosfera arricchita di anidride carbonica. Se le piastre vengono incubate senza anidride carbonica, le zone beta-emolitiche e le dimensioni delle colonie saranno inferiori e si potrà osservare un minore numero di colonie.

Esaminare le piastre dopo 18–24 h.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

X RISULTATI

Dopo 18–24 h di incubazione in atmosfera arricchita di anidride carbonica, gli streptococchi di gruppo A (*S. pyogenes*) su **ssA** appariranno come colonie traslucide od opache, bianco – grigie, piccole (1–2 mm), circondate da una zona di beta emolisi. Una riduzione delle dimensioni rispetto al controllo non selettivo, **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**, è tipica. Possono crescere colonie puntiformi o minute di streptococchi alfa-emolitici, non emolitici o di altri streptococchi beta-emolitici, che non dovrebbero comunque interferire con il recupero degli streptococchi di gruppo A o l'interpretazione dei risultati. Sul terreno **ssA** sono inibiti *Neisseria* spp., streptococchi viridans, stafilococchi, bacilli gram-negativi e la maggior parte degli streptococchi beta-emolitici non gruppo A e B. La sensibilità alla bacitracina può essere usata per differenziare gli streptococchi di gruppo A da quelli di gruppo B. La crescita lieve – intensa di colonie beta-emolitiche che evidenziano una zona di inibizione intorno al disco **BD BBL Taxo A** può essere presuntivamente refertata come *S. pyogenes*. Si può anche eseguire un test PYR (acido piroglutammico), a tal fine più specifico e tanto sensibile quanto il test della bacitracina.⁷ Eseguire colorazioni di Gram ed esaminarle.

Se vi è un numero sufficiente di colonie beta-emolitiche ben isolate, è possibile eseguire una procedura di test di tipizzazione sierologica.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Poiché non esiste un terreno perfetto, è possibile che alcuni ceppi di streptococchi di gruppo A (*S. pyogenes*) crescano in modo insoddisfacente sul terreno **ssA**; la natura dei campioni e lo stato fisiologico dei microrganismi possono influenzare il recupero delle specie desiderate e modificare gli effetti delle caratteristiche inibenti del terreno. Di conseguenza, è utile comparare la crescita su entrambi i lati della piastra doppia per ottenere maggiori informazioni e garantire il recupero ottimale di potenziali patogeni.

Questo terreno in piastra pronto per l'uso è destinato all'isolamento primario. Alcuni test diagnostici possono essere eseguiti con la piastra primaria. Per i test biochimici e le procedure sierologiche, si raccomanda tuttavia una coltura pura. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.⁶⁻⁸

XII PERFORMANCE

In una valutazione clinica condotta su 460 colture faringee, 117 sono complessivamente risultate positive per streptococchi di gruppo A su **BD BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)** rispetto alle 100 su **SXT Sheep Blood Agar** e alle 84 su **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)**. Di queste colture positive, 103 sono state identificate in base a beta emolisi e sensibilità alla bacitracina (0,04 unità) entro 24 h su terreno **ssA** rispetto alle 80 su **SXT** e alle sole 32 sul controllo agar sangue **TSA** non selettivo.⁹

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat. Descrizione

221783 **BD BBL** Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) // **BD BBL Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), confezione da 20 piastre doppie

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Evans, G.L., and T.E. O'Neill. 1984. Development of an improved selective medium for the isolation of group A streptococci from throat cultures, abstr. C-136, p. 259. Abstr. 84th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1984.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
3. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53–80.
4. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021–0045.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Ruoff, K.L., R.A. Whaley, and D. Beighton. 1999. Streptococcus, p. 283–296. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn, Jr. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
9. Carlson, J.R., W.G. Merz, B.E. Hansen, S. Ruth, and D.G. Moore. 1985. Improved recovery of group A beta-hemolytic streptococci with a new selective medium. J. Clin. Microbiol. 21:307–309.

Assistenza e supporto tecnico: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com.

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

 Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.