

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

BBL Lim Broth è usato per l'arricchimento selettivo degli streptococchi di gruppo B (*Streptococcus agalactiae*).

II PROCEDURA DEL TEST

- Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sottoelencate.
 - Usando pipette sterili da 1,0 mL, inoculare le provette con 1,0 mL di diluizioni di colture di 18 – 24 h di **Trypticase Soy Broth**. La diluizione usata deve avere una concentrazione non superiore a 1.000 UFC/mL per *S. agalactiae* e a $1,0 \times 10^5$ UFC/mL per *E. coli*.
 - Incubare le provette - con i tappi non completamente avvitati - a 35 ± 2 °C in aerobiosi.
- Esaminare le provette per un massimo di 3 giorni per verificare la crescita.
- Risultati attesi

Microorganismi	ATCC	Isolamento
* <i>Streptococcus agalactiae</i>	12386	Crescita (moderata – intensa)
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Inibizione (parziale - completa)

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

NOTA: Questo terreno è esente dai test di controllo qualità a cura dell'utente ai sensi della norma CLSI M22-A3.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

- Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
- Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
- Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $7,8 \pm 0,2$.
- Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

BBL Lim Broth è usato per l'arricchimento selettivo degli streptococchi di gruppo B (*Streptococcus agalactiae*), soprattutto da campioni genitali.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Sin dalla sua comparsa negli anni Settanta, la malattia neonatale da streptococco di gruppo B è diventata la maggiore causa infettiva di morbilità e mortalità tra i neonati. Prima del 1994, negli Stati Uniti si contavano 7.600 episodi annui di malattia invasiva da streptococco di gruppo B nei neonati, principalmente casi di sepsi e meningite, l'80% dei quali a insorgenza precoce, entro la prima settimana di vita.¹ La malattia si diffonde ai neonati tramite trasmissione verticale - da madre portatrice di streptococco di gruppo B - nel tratto genitale o anorettale. Lim et al. hanno combinato l'uso di un brodo arricchito selettivo e il test di coagulazione su vetrino per effettuare lo screening rapido di tali pazienti ostetriche.²⁻⁵

I CDC (Centers for Disease Control and Prevention) hanno proposto linee guida per lo screening e l'uso di chemioprolifassi intrapartum per la prevenzione della malattia neonatale da streptococco di gruppo B.⁶ L'uso del brodo Todd Hewitt con colistina e acido nalidixico è raccomandato per massimizzare le probabilità di recupero degli streptococchi di gruppo B in colture su piastra in agar sangue di montone.¹ Il brodo Lim si prepara aggiungendo al brodo Todd Hewitt colistina e acido nalidixico, nelle concentrazioni raccomandate, più estratto di lievito per migliorare la crescita degli streptococchi di gruppo B.²

Gli streptococchi di gruppo B sono stati riscontrati anche in casi di sepsi in non puerpere e in uomini, nonché in infezioni articolari, osteomielite, infezioni delle vie urinarie e infezioni delle ferite. Sono associati a endocardite, polmonite e infezioni cutanee e dei tessuti molli in pazienti immunocompromessi.⁷

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il brodo base Todd Hewitt è un terreno universale principalmente usato per la coltivazione di streptococchi beta-emolitici, soprattutto per studi sierologici.⁸

I peptoni, il destrosio e i sali forniscono un'eccellente base nutrizionale per la crescita degli streptococchi. L'estratto di lievito aggiunto è una ricca fonte di vitamine del complesso B. Il destrosio stimola la produzione di emolisina. Fosfato disodico e carbonato di sodio forniscono un'azione tampone per contrastare l'acidità prodotta durante la fermentazione del carboidrato, proteggendo così l'emolisina dall'inattivazione acida. L'acido nalidixico e la colistina sopprimono la crescita dei batteri gram-negativi.

VII REAGENTI:

Lim Broth

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Cuore, infuso (solidi).....	3,1	g
Peptone.....	20,0	g
Destrosio.....	2,0	g
Cloruro di sodio.....	2,0	g
Fosfato disodico.....	0,4	g
Carbonato di sodio.....	2,5	g
Estratto di lievito.....	10,0	g
Colistina.....	0,01	g
Acido nalidixico.....	0,015	g

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

Avvertenze e precauzioni: Per uso diagnostico *in vitro*.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

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".⁹⁻¹² Dopo l'uso, le provette 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 provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso, possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per i tempi di incubazione raccomandati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto: Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.^{7,13} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito: Lim Broth

Materiali necessari ma non forniti: Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test: Adottare tecniche asettiche.

Inoculare le provette e incubare - con i tappi non completamente avvitati - a 35 ± 2 °C in aerobiosi con o senza aggiunta di anidride carbonica. Se lo si desidera, dopo 5 h di incubazione eseguire un test di coagulazione su vetrino per gli streptococchi di B.⁴

Se si osserva torbidità dopo 18 – 24 h, eseguire una subcoltura dal brodo di coltura in una piastra agar sangue di montone; altrimenti, incubare per altre 24 h prima di gettare.¹

Controllo di qualità a cura dell'utente: Vedere "Procedure di controllo di qualità".

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.

Per determinare fotometricamente il pH dei terreni in provetta, usare un singolo elettrodo di dimensioni sufficientemente ridotte da permetterne l'inserimento nelle provette. Posizionare la punta dell'elettrodo al di sotto della superficie del brodo.

X RISULTATI

La crescita nel brodo è indicata dalla presenza di torbidità rispetto al controllo non inoculato.

Eseguire una subcoltura in **Trypticase** Soy Agar con sangue di montone al 5% (TSA II) e incubare per 18 – 24 h oppure sino a 48 h, se necessario. Identificare i microrganismi compatibili con streptococchi di gruppo B (beta o non-emolitici, cocchi gram-positivi e catalasi-negativi). Si può eseguire un'identificazione specifica, per esempio usando sieri di tipizzazione streptococcica, il test CAMP o altre procedure.

Jones et al. hanno descritto la rilevazione di streptococchi di gruppo B mediante coagulazione su vetrino dopo 5 h di incubazione in presenza di una concentrazione di microrganismi uguale o superiore a 10⁷ per mL.⁴

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.^{7,13,14}

XII PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Nguyen et al. hanno usato Lim Broth in combinazione con **Trypticase** Soy Agar con sangue di montone al 5% (TSA) come "gold standard" per la rilevazione di streptococco di gruppo B dal tratto genitale inferiore di donne in gravidanza. 90 donne su 524 hanno presentato colture positive con Lim Broth o TSA. La sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo e il valore predittivo negativo di Lim Broth sono risultati rispettivamente pari a 97% (87/90), 100% (434/434), 100% (87/87) e 97% (434/437).¹⁵

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
292209	BD BBL Lim Broth, 5 mL, confezione da 10 provette di misura K
296266	BD BBL Lim Broth, 5 mL, cartone da 100 provette di misura K

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Federal Register. 1994. Prevention of group B streptococcal disease: a public health perspective. Fed. Regist. 59:64764-64773.
2. Jones, D.E., E.M. Friedl, K.S. Kanarek, J.K. Williams, and D.V. Lim. 1983. Rapid identification of pregnant women heavily colonized with group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 18:558-560.
3. Lim, D.V., K.S. Kanarek, and M.E. Peterson. 1982. Magnitude of colonization and sepsis by group B streptococci in newborn infants. Curr. Microbiol. 7:99-101.
4. Jones, D.E., K.S. Kanarek, and D.V. Lim. 1984. Group B streptococcal colonization patterns in mothers and their infants. J. Clin. Microbiol. 20:438-440.
5. Jones, D.E., K.S. Kanarek, J.L. Angel, and D.V. Lim. 1983. Elimination of multiple reactions of the Phadebact *Streptococcus* coagglutination test. J. Clin. Microbiol. 18:526-528.
6. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Morbid. Mort. Weekly Rep.51 (No. RR-11):1.
7. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
8. Todd, E.W., and L.F. Hewitt. 1932. A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. J. Pathol. Bacteriol. 35:973-974.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.) 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
15. Nguyen, T.M. et al. 1998. Detection of group B *Streptococcus*: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. J. Matern. Fetal. Med. Jul-Aug; 7(4):172-176.

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



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.
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD.