

### PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

#### I INTRODUZIONE

**BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (BD BBL Trypticase Soy Agar con sangue di montone al 5%)** è utilizzato per la crescita di microrganismi esigenti e la visualizzazione di reazioni emolitiche. Il terreno **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** è usato per l'identificazione presuntiva di *Escherichia coli*.

#### II PROCEDURA DEL TEST

##### A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

- Inoculare i campioni rappresentativi con diluizioni delle colture sottoelencate.
  - Usando un pipettatore volumetrico o un sistema equivalente, dispensare in ogni piastra 0,1 mL di una diluizione avente una concentrazione di 30–300 UFC e inoculare distribuendo con un apposito diffusore sterile di vetro.
  - Incubare i ceppi di *Stafilococco* e di *Escherichia* a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  in aerobiosi e i ceppi di *Streptococco* a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  in atmosfera aerobica supplementata con anidride carbonica.
- Esaminare le piastre dopo 18–24 h per verificare crescita, dimensioni delle colonie e reazioni emolitiche.
- Risultati attesi

| Microrganismi di controllo CLSI   | (Ceppi 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.

##### B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

- Inoculare i campioni rappresentativi con diluizioni delle colture sottoelencate.
  - Strisciare le piastre per l'isolamento usando brodi di coltura di 18–24 h diluiti  $10^{-1}$ . Per *Proteus mirabilis*, eseguire altre due diluizioni di dieci volte prima dello striscio.
  - Incubare le piastre a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  in aerobiosi.
  - Includere piastre di **BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% come controlli non selettivi per tutti i microrganismi.
- Esaminare le piastre dopo 18–48 h per verificare crescita, fluorescenza, pigmentazione e selettività.
- Risultati attesi

| Microrganismi                                                                 | ATCC  | Recupero                            | Colore delle colonie                        | Fluorescenza |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------|---------------------------------------------|--------------|
| * <i>Escherichia coli</i>                                                     | 25922 | Crescita                            | Colonie rosa - rosse                        | +            |
| <i>Proteus mirabilis</i>                                                      | 12453 | Crescita                            | Colonie incolori, inibizione dello sciamare | –            |
| * <i>Salmonella enterica</i><br>ssp. <i>enterica</i><br>sierotipo Typhimurium | 14028 | Crescita                            | Colonie incolori                            | –            |
| * <i>Enterococcus faecalis</i>                                                | 29212 | Inibizione<br>(parziale - completa) | N/A                                         | –            |

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

#### III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

- Esaminare le piastre come descritto in "Deterioramento del prodotto".
- Eseguire un esame visivo delle piastre 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  $7,4 \pm 0,2$  (TSA II) e  $7,1 \pm 0,2$  (BD BBL MacConkey II agar with MUG).
- Verificare la stabilità delle piastre durante la procedura di inoculo.
- Incubare a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 72 h le piastre rappresentative non inoculate ed esaminarle per verificare la contaminazione microbica.

### INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

#### IV USO PREVISTO

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

Il terreno MacConkey II Agar with MUG è usato per l'identificazione presuntiva di *Escherichia coli*.

#### V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

##### A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

Grazie alla composizione nutritiva, **BD 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% 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.

## B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

La formulazione di **BD BBL MacConkey II Agar** è stata concepita nel 1983 specificamente per migliorare l'inibizione delle specie *Proteus* sciamentanti, ottenere una migliore differenziazione dei microrganismi fermentanti e non fermentanti il lattosio e per favorire una maggiore crescita dei patogeni enterici.

Trepeta ed Edberg<sup>1</sup> hanno modificato l'agar MacConkey incorporando MUG (4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide). Il terreno così ottenuto ha loro consentito di identificare presuntivamente *E. coli* dal terreno in piastra primario, entro 5 min.

## VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

### A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

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

Il sangue di montone defibrinato è il sangue più ampiamente usato come arricchimento dei terreni agar base.<sup>2</sup> Le reazioni emolitiche degli streptococchi sono appropriate e la crescita di *Haemophilus haemolyticus*, un ceppo non patogeno le cui colonie emolitiche non sono distinguibili da quelle degli streptococchi beta-emolitici, è inibita.

**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 Taxo A**) per l'identificazione presuntiva di streptococchi di gruppo A (*S. pyogenes*).

### B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

**BD BBL MacConkey II Agar** è un terreno selettivo e differenziale, seppure a moderata selettività, in quanto la concentrazione di sali biliari – che inibisce i microrganismi gram-positivi – è bassa rispetto a quella di altri terreni enterici in piastra. Il terreno include anche cristallio violetto per inibire la crescita dei batteri gram-positivi, soprattutto enterococchi e stafilococchi.

La differenziazione dei microrganismi enterici si ottiene mediante combinazione del lattosio con l'indicatore rosso neutro. Vengono prodotte colonie incolore o rosa-rosse, a seconda della capacità dell'isolato di fermentare il carboidrato.

La maggior parte dei ceppi (96–97%) di *E. coli* produce β-D-glucuronidasi,<sup>3</sup> enzima che idrolizza MUG per formare 4-metilumbelliferone, un composto che sviluppa fluorescenza alla luce UV a onda lunga (366 nm). L'aggiunta di MUG alla formulazione consente ai ceppi β-D-glucuronidasi-positivi di *E. coli* di sviluppare una fluorescenza blu-verde allorché esaminati alla luce UV.

## VII REAGENTI

### BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)

Formula approssimata\* per L di acqua purificata

|                                          |        |                                    |        |
|------------------------------------------|--------|------------------------------------|--------|
| Digerito pancreatico di caseina .....    | 14,5 g | Agar .....                         | 14,0 g |
| Digerito papaico di farina di soia ..... | 5,0 g  | Fattori di crescita .....          | 1,5 g  |
| Cloruro di sodio .....                   | 5,0 g  | Sangue di montone defibrinato..... | 5%     |

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

### BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Formula approssimata\* per L di acqua purificata

|                                          |        |                                                |         |
|------------------------------------------|--------|------------------------------------------------|---------|
| Digerito pancreatico di gelatina .....   | 17,0 g | Cloruro di sodio .....                         | 5,0 g   |
| Digerito pancreatico di caseina .....    | 1,5 g  | Rosso neutro .....                             | 0,03 g  |
| Digerito peptico di tessuto animale..... | 1,5 g  | Cristallio violetto .....                      | 0,001 g |
| Lattosio .....                           | 10,0 g | MUG (4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide)..... | 0,1 g   |
| Sali biliari .....                       | 1,5 g  | Agar .....                                     | 13,5 g  |

\*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".<sup>4-7</sup> 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 provette 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 idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.<sup>8,9</sup> Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

## IX PROCEDURA

### Materiale fornito

**BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** e **BD BBL MacConkey II Agar with MUG (BD I Plate)**

### 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.

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 inoculata.

Incubare le piastre, al riparo dalla luce, a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 18–24 h. Con campioni dalle vie respiratorie, incubare in atmosfera aerobica supplementata con anidride carbonica. Con altri campioni, incubare in atmosfera aerobica *senza* aggiunta di  $\text{CO}_2$ .

### 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 l'incubazione, la maggiore parte delle piastre evidenzia un'area di crescita confluyente. Poiché la procedura di striscio è in effetti una tecnica di "diluizione", quantità decrescenti di microrganismi vengono depositate nelle aree strisciate. Di conseguenza, una o alcune di queste aree devono presentare colonie isolate dei microrganismi contenuti nel campione. La crescita di ogni microrganismo può inoltre essere classificata semiquantitativamente in base alla crescita di ciascuna delle aree strisciate.

I risultati tipici su **BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% sono i seguenti.

1. Gli streptococchi emolitici possono apparire come colonie traslucide od opache, grigiastre, piccole (1 mm) o grandi opache e mucoidi (2–4 mm), circondate da una zona di emolisi. Eseguire colorazioni di Gram ed esaminarle per verificare i riscontri macroscopici. Gli altri microrganismi che possono provocare emolisi comprendono *Listeria*, vari corinebatteri, stafilococchi emolitici, *Escherichia coli* e *Pseudomonas*.

In sede di refertazione, la quantificazione approssimata della quantità di colonie di streptococchi emolitici può essere utile al clinico.

2. Gli pneumococchi di solito appaiono come colonie estremamente piatte, omogenee, traslucide, grigiastre e talvolta mucoidi, circondate da una stretta zona di emolisi "verde" (alfa).
3. Gli stafilococchi appaiono come colonie opache, bianche - giallo oro, con o senza zone di beta emolisi.
4. *Listeria*. Vengono prodotte piccole zone di beta emolisi. Possono essere distinte grazie alla forma bastoncellare nella colorazione e alla motilità a temperatura ambiente.
5. In questa formulazione non selettiva, è possibile che crescano altri microrganismi che rappresentano isolati clinicamente significativi e flora minima.

La tipica morfologia delle colonie su **BD BBL Trypticase MacConkey II Agar with MUG** è la seguente.

Le colonie di batteri fermentanti il lattosio appaiono di colore rosa o rosa-rosso e possono essere circondate da una zona di precipitazione biliare, mentre le colonie non fermentanti il lattosio sono incolori. Esaminare il terreno a luce UV a onda lunga (366 nm). Le colonie  $\beta$ -D-glucuronidasi-positive sviluppano una fluorescenza blu-verde, mentre quelle  $\beta$ -D-glucuronidasi-negative non sviluppano alcuna fluorescenza.

## XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

È stato riportato che alcuni ceppi di *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* sono inibiti su **BD BBL Trypticase MacConkey Agar** allorché incubati in atmosfera arricchita di  $\text{CO}_2$ .<sup>10</sup>

Non tutti i ceppi di *E. coli* fermentano il lattosio o producono  $\beta$ -D-glucuronidasi. Alcuni ceppi di *Salmonella* e *Shigella* producono  $\beta$ -D-glucuronidasi e sviluppano fluorescenza.<sup>11</sup> È stato dimostrato che una piccola percentuale di *Yersinia* e streptococchi sviluppa fluorescenza.<sup>12</sup>

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.<sup>8,9,13</sup>

## XII PRESTAZIONI METODOLOGICHE

### BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

**BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** è stato usato come controllo in uno studio in cui sono state impiegate una coltura migliorata con brodo (Todd Hewitt) e metodica con immunodosaggio ottico per la diagnosi di infezione da streptococchi  $\beta$ -emolitici. Sono stati testati cinquecentodue (502) campioni. TSA con sangue di montone al 5% ha raggiunto una sensibilità e una specificità rispettivamente del 92,5% e 99,4%.<sup>14</sup> Nguyen et al. hanno usato **BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% come "gold standard" per la rilevazione di streptococco di gruppo B dal tratto genitale inferiore di donne in gravidanza.<sup>15</sup> In un altro studio, Rossmann et al. hanno reisolato con successo *Lautropia mirabilis* su **BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% dalla cavità orale di bambini infettati da virus dell'immunodeficienza umana.<sup>16</sup> Degli 85 bambini valutati in questo studio, 35 (41,4%) sono risultati positivi per *L. mirabilis*. Isenberg et al. hanno usato **BD BBL Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5% come controllo per valutare il recupero di enterococco da un terreno selettivo oggetto di studio.<sup>17</sup> Sono stati usati duecentocinquanta (250) ceppi di streptococchi di gruppo D isolati da materiale clinico e 8 ceppi ottenuti dal National Communicable Disease Center (Atlanta, Georgia).

### BD BBL MacConkey II Agar with MUG

In uno studio clinico condotto in un ospedale e in una facoltà di medicina, il MUG è stato incorporato nel terreno **BD BBL MacConkey II Agar** per rilevare la presenza di  $\beta$ -glucuronidasi. Tale incorporazione ha consentito di ridurre da un'ora a cinque minuti il tempo di identificazione di ceppi di *E. coli* e di migliorare la capacità di identificare questo microrganismo in campioni misti.<sup>1</sup>

### XIII DISPONIBILITÀ

#### N. di cat. Descrizione

221949 **BD BBL Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) e **BD BBL MacConkey II** Agar with MUG – **BD I Plate**

### XIV BIBLIOGRAFIA

1. Trepeta, R.W., and S.C. Edberg. 1984. Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 19:172-174.
2. Vera, H.D., and D.A. Power. 1980. Culture media, p. 969. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Truant (ed.), Manual of clinical microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Killian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B, 84:245-251.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO<sub>2</sub> vs. ambient incubation, abstr. C 179, p. 339. Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1979.
11. Feng, P.C.S., and P.A. Hartman. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1320-1329.
12. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. Appl. Environ. Microbiol. 48:285-288.
13. 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.
14. Fries, S.M. 1995. Diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in a private clinic: comparative evaluation of an optical immunoassay method and culture. J. Pediatr. 126:933-936.
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. 7:172-176.
16. Rossmann, S.N. et al. 1998. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. J. Clin. Microbiol. 36:1756-1760.
17. Isenberg, H.D., D. Goldberg, and J. Sampson, 1970. Laboratory studies with a selective medium. Appl. Microbiol. 20: 433-436.

Assistenza e supporto tecnico: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito [www.bd.com](http://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.