BD BBL™ CHROMagar™ Staph aureus

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 100503

USO PREVISTO

BBL CHROMagar Staph aureus è un terreno selettivo per l'isolamento, la conta e l'identificazione di Staphylococcus aureus da fonti cliniche e alimentari. Non sono necessari test di conferma di isolati tipici da fonti cliniche.

BBL CHROMagar Staph aureus (terreno su piastra pronto per l'uso) è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods per l'analisi di gusci d'uovo, salmone affumicato e carne di manzo cotta con l'impiego delle metodiche AOAC e ISO.[1,2] Sono necessari test di conferma delle colonie color malva ottenute dalle matrici alimentari sopra citate.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodica microbiologica.

Lo *Staphylococcus aureus* è un patogeno ben documentato, responsabile di infezioni sia superficiali che sistemiche.[3,4] A causa della prevalenza di questo microrganismo e delle relative implicazioni cliniche, la sua rilevazione è della massima importanza.

L'avvelenamento alimentare da stafilococco causato da *S. aureus* è uno dei tipi più comuni di malattia di origine alimentare in tutto il mondo. La rilevazione e la conta di tale microrganismo contribuiscono a fornire non soltanto informazioni sul potenziale pericolo per la salute costituito da generi alimentari ma rappresentano anche un indicatore di scarsa igiene.[5] Questo microrganismo è inoltre raccomandato anche come indicatore della qualità dell'acqua.[6]

BBL CHROMagar Staph aureus è destinato all'isolamento, la conta e l'identificazione di *S. aureus* in base alla formazione di colonie color malva. L'aggiunta di substrati cromogeni al terreno facilita la differenziazione di *S. aureus* da altri microrganismi.

Un vantaggio di **BBL CHROMagar Staph aureus** rispetto ad alcuni terreni tradizionali, come per esempio il Baird-Parker Agar, è la capacità di identificare *S. aureus* in sole 24 h anziché 48 h.

BBL CHROMagar Staph aureus è stato originariamente sviluppato da A. Rambach, CHROMagar, Parigi, Francia. Ai sensi di un contratto di licenza, BD ha ottimizzato tale formulazione avvalendosi della proprietà intellettuale esclusiva usata nella produzione del terreno su piastra pronto per l'uso **BBL CHROMagar Staph aureus**. I nutrienti sono forniti da peptoni **Difco** appositamente selezionati. L'incorporazione di agenti selettivi inibisce la crescita di microrganismi gram-negativi, lieviti e alcuni cocchi gram-positivi. La miscela cromogena è costituita da substrati artificiali (cromogeni), che liberano composti colorati insolubili quando vengono idrolizzati da alcuni enzimi specifici. Ciò facilita la rilevazione e differenziazione di *S. aureus* da altri microrganismi. *S. aureus* utilizza uno dei substrati cromogeni, sviluppando colonie color malva. La crescita di colonie color malva dopo 24 h è considerata positiva per *S. aureus* su **BBL CHROMagar Staph aureus**. I batteri diversi da *S. aureus* possono utilizzare altri substrati cromogeni dando luogo a colonie di colore blu - blu/verde oppure, se non si utilizzano substrati cromogeni, di colore naturale.

*I CAMPIONI FORNITI DAL PRODUTTORE DI QUESTO MODELLO DI KIT PER TEST SONO STATI VALUTATI IN MODO INDIPENDENTE DALL'AOAC RESEARCH INSTITUTE E SONO RISULTATI CONFORMI ALLE SPECIFICHE PRESTAZIONALI RIPORTATE NEL FOGLIETTO ILLUSTRATIVO ALLEGATO AL KIT. IL PRODUTTORE CERTIFICA CHE QUESTO KIT È CONFORME SOTTO TUTTI GLI ASPETTI ALLE SPECIFICHE ORIGINARIAMENTE VALUTATE DALL'AOAC RESEARCH INSTITUTE, SECONDO QUANTO RIPORTATO NEL *Performance Tested Methods* - CERTIFICATO NUMERO 100503.

REAGENTI

BBL CHROMagar Staph aureus

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Cromopeptone	40,0 g
Cloruro di sodio	25,0 g
Miscela cromogena	50,0 mL
Agenti inibitori	0,07 g
Agar	14,0 g

pH: 6.8 +/- 0.2

*Formulazione aggiustata e/o supplementata per soddisfare i criteri prestazionali.

PRECAUZIONI

IVD . Solo per uso professionale.

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. Proteggere la piastra dalla luce mentre si asciuga. Vedere **CONSERVAZIONE E VITA UTILE**.

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

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e 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.[7-10]

Durante tutte le procedure, attenersi alle tecniche asettiche e alle precauzioni stabilite contro i rischi microbiologici.

Dopo l'uso, le piastre pronte per l'uso, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Per dettagli su procedure di manipolazione un asepsi, rischi biologici e smaltimento di 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 congelamento e 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

Controllare le prestazioni inoculando un campione rappresentativo di piastre con colture pure di microrganismi di controllo stabili che producono reazioni note e attese (per dettagli, vedere il documento **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**). Si raccomandano i ceppi per test indicati nella tabella sottostante. Incubare al buio, in aerobiosi per 18–24 h a 35 ± 2 °C.

Ceppi	**Risultati della crescita**
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Crescita; colonie malva
Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305	Crescita; colonie dal verde al blu-verde
Proteus mirabilis ATCC 12453	Inibizione (da parziale a completa)
Non inoculati	Da incolore a leggermente ambra, da trasparente a lievemente opaca

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 del laboratorio specifico. Per una corretta esecuzione delle procedure relative al controllo di qualità, si raccomanda di consultare le linee guida Clinical and Laboratory Standards Institute (già NCCLS) in materia.

PROCEDURA

Materiali forniti

BBL CHROMagar Staph aureus, fornito in piastre **Stacker** da 90 mm.

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

Tipi di campioni
Per informazioni dettagliate sulle procedure di raccolta e trattamento dei campioni, consultare la documentazione o le norme appropriate. Questo terreno è usato per l'isolamento di *Staphylococcus aureus* da campioni clinici di qualsiasi tipo. Vedere anche **CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**.
Test agroalimentari: per informazioni dettagliate sulla preparazione e sul trattamento dei campioni in base al tipo di campione e alla località geografica, seguire le metodiche standard appropriate.

Procedura del test
Adottare tecniche asettiche. La superficie agar deve essere omogenea e non eccessivamente umida. Campioni clinici: non appena pervengono in laboratorio, inoculare i campioni su una piastra **BBL CHROMagar Staph aureus** e strisciare per l'isolamento. Se il campione è posto in coltura da tampone, passare delicatamente il tampone su una piccola area della superficie in corrispondenza del bordo e strisciare da quest'area con un'ansa. Incubare le piastre in aerobiosi a 35 ± 2 °C per 20–24 h in posizione capovolta (lato agar rivolto verso l'alto).

Campioni alimentari: consultare la documentazione appropriata e seguire le metodiche standard applicabili. Inoculare i campioni alimentari omogeneizzati in **BBL CHROMagar Staph aureus** distribuendoli uniformemente sulla piastra. Incubare le piastre in aerobiosi a 35–37 °C per 20–28 h in posizione capovolta (lato agar rivolto verso l'alto).

Risultati
Dopo un'incubazione appropriata, leggere le piastre su uno sfondo bianco. *S. aureus* produce sul terreno **BBL CHROMagar Staph aureus** colonie che presentano una colorazione da malva ad arancione/malva. La maggior parte dei microrganismi gram-positivi, se non inibita, produce colonie di colore blu, blu-verde o naturale (incolore, bianco o crema). I lieviti e i microrganismi gram-negativi sono parzialmente o completamente inibiti.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Risultati prestazionali[12]

Test clinici

1. In uno studio sul campo condotto in un grande ospedale statunitense, **BBL CHROMagar Staph aureus** è stato utilizzato per valutare 201 campioni faringei e di espettorato prelevati da pazienti con fibrosi cistica e 459 campioni nasali prelevati da altri pazienti ospedalizzati. **BBL CHROMagar Staph aureus** è stato comparato con agar sangue o Mannitol Salt Agar, con conferma dell'isolato mediante coagulasi su vetrino. *S. aureus* è stato recuperato da 190 campioni combinati. **BBL CHROMagar Staph aureus** ha rilevato 9 colture positive a *S. aureus* aggiuntive, non recuperate su terreni convenzionali. Sul terreno **BBL CHROMagar Staph aureus**, dopo un'incubazione di 24 h, sono stati inoltre osservati quattro potenziali falsi positivi: Due corinebatteri e due stafilococchi coagulasi-negativi. **BBL CHROMagar Staph aureus** ha prodotto una sensibilità complessiva del 99,5% e una specificità del 99,2%.[11]

2. In uno studio condotto in Europa, centosessantacinque (165) campioni, di cui 100 di positività accertata (presenza di *S. aureus* accertata mediante metodiche standard) e 65 di negatività accertata, sono stati strisciati su **BBL CHROMagar Staph aureus**, Mannitol Salt Agar e Columbia Agar con sangue di montone al 5%. I tipi di campioni sono illustrati nella Tabella 1. Le piastre sono state incubate a 35 - 37 °C per 20 - 24 ore, trascorse le quali è stata verificata l'eventuale presenza di sospette colonie di *S. aureus*. Sono stati allestiti test della coagulasi in provetta da tutte le colonie sospette su tutti e tre i terreni ed è stata inoltre determinata l'entità della crescita di *S. aureus* (valutata semi-quantitativamente).

Tabella 1. Tipi di campioni

Tipi di campioni	Campioni di positività accertata per *S. aureus*	Campioni di negatività accertata per *S. aureus*
Ascessi	14	6
Liquido ascitico	1	0
Ossa	1	0
Borsa	1	0
Catetere	4	0
Drenaggio	1	0
Fistola	0	1
Campioni chirurgici	12	15
Tamponi vari	12	19
Flemmoni	1	0
Secrezioni tracheali	1	0
Ferite	52	24
Totale	100	65

Risultati - Su 165 campioni, 100 hanno evidenziato crescita di *S. aureus* su qualsiasi terreno, come confermato dai test della coagulasi di tutti i terreni.
Su **CHROMagar Staph aureus**, 100 campioni hanno evidenziato crescita di *S. aureus*; su Mannitol Salt Agar, 91 hanno evidenziato *S. aureus*; su Columbia Agar in combinazione con test della coagulasi, 98 campioni sono risultati positivi per *S. aureus*. È stato riscontrato un solo falso positivo su **BBL CHROMagar Staph aureus**, che è risultato essere *Streptococcus agalactiae*. All'esecuzione di un nuovo striscio del ceppo su **BBL CHROMagar Staph aureus**, le colonie sono risultate violette anziché rosa - malva.
Tra i campioni di negatività accertata, sono state riscontrate 5 colture con colonie di colore violetto o lilla, simili a *S. aureus,* risultate tuttavia facilmente distinguibili dalle colonie *S. aureus* (=rosa-malva) anche al lettore privo di notevole familiarità con i colori di colonie delle diverse specie che crescono sul terreno (a cui, prima dell'inizio dello studio, era stato consegnato soltanto un sommario dei colori e dei microrganismi che si riscontrano sul terreno).
Le sensibilità di **BBL CHROMagar Staph aureus** (in base al colore rosa-malva delle colonie), Mannitol Salt Agar (in base alle colonie circondate da terreno di colore giallo) e Columbia Agar (crescita di colonie tipiche di *S. aureus* in combinazione con test della coagulasi) sono state rispettivamente del 100%, 91% e 98%. La specificità di **BBL CHROMagar Staph aureus** è risultata del 98,5%.
Su **BBL CHROMagar Staph aureus**, l'intensità della crescita è stata significativamente più frequentemente superiore rispetto a MSA (p= 0,05); vedere la Tabella 2.
BBL CHROMagar Staph aureus può essere usato per un'ampia gamma di campioni.

Tabella 2. Intensità della crescita di isolati di *S. aureus* su CSA* rispetto a MSA*

	Intensità della crescita					
	CSA = Col	CSA> Col	Col>CSA	CSA=MSA	CSA>MSA	MSA>CSA
Numero di campioni	74	12	14	74	18**	8

* CSA, **BBL CHROMagar Staph aureus**; MSA, Mannitol Salt Agar; Col, Columbia Agar con sangue di montone al 5%
** differenza statisticamente significativa (p= 0,05)

Test agroalimentari

BBL CHROMagar Staph aureus è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods. Il recupero e la conta di *S. aureus* in carne di manzo cotta, salmone affumicato e gusci d'uovo mediante tale terreno sono stati valutati sia da un laboratorio di riferimento esterno che all'interno di BD. Il recupero e la conta di *S. aureus* su **BBL CHROMagar Staph aureus** sono stati comparati con il terreno su piastra di riferimento AOAC e ISO, Baird-Parker Agar, usando i diluenti raccomandati a livelli di inoculo di *S. aureus* bassi, medi e alti. La conta è stata

eseguita su **BBL CHROMagar Staph aureus** dopo un'incubazione di 24 h e su Baird-Parker Agar dopo 48 h. All'analisi statistica, non è emersa alcuna differenza significativa tra le metodiche di riferimento e la metodica **BBL CHROMagar Staph aureus** per alcun tipo di alimento o livello di contaminazione, a eccezione del campione di salmone affumicato a basso livello. Il basso livello di contaminazione del salmone affumicato ha dimostrato una differenza statistica nei test interni con la metodica ISO, in quanto la metodica **BBL CHROMagar Staph aureus** dopo 24 h ha recuperato un numero di colonie maggiore (log_{10} = 2,04) rispetto al riferimento ISO dopo 48 h (log_{10} = 1,64). Le stime di precisione – ripetibilità della metodica **BBL CHROMagar Staph aureus** sono risultate soddisfacenti. I coefficienti di correlazione sono risultati compresi tra il 92,6% e il 99,4%, a dimostrare una buona correlazione tra tutti i livelli di contaminazione in tutte le tipologie alimentari. I dati sono sintetizzati nelle Tabelle 1 e 2. Con **BBL CHROMagar Staph aureus**, non è stata recuperata alcuna colonia falsamente positiva dalle matrici alimentari. Tutte le colonie malva sono state confermate come *S. aureus* senza alcuna discrepanza. Sono stati inoltre valutati 30 ceppi di *S. aureus*, inclusi ceppi a produzione di enterotossina accertata e 37 isolati non *S. aureus,* generando entrambi sensibilità e specificità del 100% su **BBL CHROMagar Staph aureus**.[11]

Tabella 1. Sintesi dei test esterni AOAC e ISO di carne di manzo cotta e gusci d'uovo[1-3]

		AOAC		
	Livello di inoculo	**Paired t-test o ANOVA a una via[a]**	**Ripetibilità (deviazione standard)[b]**	**Quadrato del coefficiente di correlazione lineare**
Carne di manzo cotta	Basso	Non significativo	0,398	96,0%
	Terreno	Non significativo	0,04	
	Alto	Non significativo	0,062	
Gusci d'uovo	Basso	Non significativo	0,302	95,5%
	Terreno	Non significativo	0,089	
	Alto	Non significativo	0,143	
		ISO		
	Livello di inoculo	**Paired t-test o ANOVA a una via[a]**	**Ripetibilità (deviazione standard)[b]**	**Quadrato del coefficiente di correlazione lineare[c]**
Carne di manzo cotta	Basso	Non significativo	0,315	94,6%
	Terreno	Non significativo	0,045	
	Alto	Non significativo	0,117	
Gusci d'uovo	Basso	Non significativo	0,341	92,6%
	Terreno	Non significativo	0,223	
	Alto	Non significativo	0,135	

Note: vedere Tabella 2.

Tabella 2. Sintesi dei test esterni e interni AOAC e ISO di salmone affumicato

	Livello di inoculo	**Paired t-test o ANOVA a una via[a]**		**Ripetibilità (deviazione standard)[b]**		**Quadrato del coefficiente di correlazione lineare[c]**	
Salmone affumicato AOAC	Basso	Non significativo	Non significativo	0,132	0,271	99,4%	93,2%
	Terreno	Non significativo	Non significativo	0,055	0,095		
	Alto	Non significativo	Non significativo	0,064	0,161		
Salmone	Basso	Non significativo	Significativo[d]	0,158	0,227	98,7%	97,4%
	Terreno	Non significativo	Non significativo	0,135	0,165		

affumicato ISO	Alto	Non significativo	Non significativo	0,116	0,033		

a Paired t-test e analisi ANOVA a una via, usati per valutare prestazioni comparabili di **BBL CHROMagar Staph aureus** rispetto al terreno di riferimento, mediante comparazione della media del $\log_{10}$ delle conte delle colonie.
b La ripetibilità dimostra che **BBL CHROMagar Staph aureus** fornisce risultati comparabili tra i test eseguiti con materiali e metodiche identici.
c Il quadrato del coefficiente di correlazione è usato per valutare la precisione di metodiche quantitative per conte *S. aureus* diverse.
d **BBL CHROMagar Staph aureus** ha recuperato un numero di colonie maggiore rispetto alla metodica di riferimento ISO.

Limitazioni della procedura

Alcuni ceppi di stafilococchi diversi da *S. aureus*, quali *S. cohnii, S. intermedius* e *S. schleiferi*, nonché corinebatteri e lieviti, possono occasionalmente produrre colonie color malva dopo 24 h.[11] La differenziazione di *S. aureus* da non *S. aureus* può essere effettuata mediante coagulasi, altri agenti biochimici o colorazione di Gram. È inoltre possibile rilevare bacilli gram-negativi resistenti, che di norma appaiono come piccole colonie blu.
Si sconsiglia un'incubazione di oltre 24 h (campioni clinici) e 28 h (campioni alimentari) a causa dell'aumento di potenziali falsi positivi. In caso di superamento dei tempi di incubazione, confermare le colonie color malva prima di refertarle come *S. aureus*.
Un'incubazione di durata inferiore rispetto alle 20 h raccomandate, determinerà una minore percentuale di risultati corretti.
Data la naturale pigmentazione dorata di alcuni ceppi *S. aureus*, il colore delle colonie può apparire arancio/malva.

BIBLIOGRAFIA

1. AOAC Official Method 9755.55. Staphylococcus aureus in foods. Surface plating method for isolation and enumeration. 1976.
2. International Organization for Standards (ISO). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird Parker agar medium, 1st ed., ISO 6888-1:1999.
3. Jablonski, L.M. and G.A. Bohach. 1997. *Staphylococcus aureus*. In M. Doyle, L. Beuchat and T. Montville (eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM, Washington, DC.
4. Bannerman, T.L. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Yolken (eds.), Manual of clinical microbiology, 8th edition. ASM, Washington DC.
5. Bennett, R.W. and G.A. Lancette. 1998. *Staphylococcus aureus*. In FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
6. Toranzos, G.A., G.A. McFeters and J.J. Borrego. 2002. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In C. Hurst, R. Crawford, G. Knudsen, M. McInerney and L. Stetzenbach (eds.), Manual of environmental microbiology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved Guideline M29. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections.*Search for latest version at* **www.clsi.org**
8. 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.
9. 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, DC.
10. 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.
11. Data on file, BD Diagnostic Systems.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

REF 257074	Terreni su piastra pronti per l'uso, confezioni da 20
REF 257099	Terreni su piastra pronti per l'uso, confezioni da 120

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.

Becton Dickinson GmbH
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

http://www.bd.com
http://www.bd.com/europe/regulatory/

AOAC is a trademark and Performance Tested is a service mark of AOAC International.
CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.
Difco is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD