ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO
Terreni di coltura pronti all'uso e parzialmente completati

Il presente documento fornisce informazioni sulla struttura dei documenti di **Istruzioni per l'uso** e contiene ulteriori informazioni sull'utilizzo dei terreni **BD** pronti all'uso e parzialmente completati.

Ulteriori informazioni non fornite nei singoli documenti di Istruzioni per l'uso sono fornite in questa sede all'interno di caselle di testo.

L'**intestazione** della pagina 1 di tutti i documenti contiene il **marchio CE**, se il prodotto è IVD, in base alla direttiva europea relativa ai dispostivi per uso diagnostico in vitro (IVD).[1] Sono inoltre indicati il **numero e la *versione* del documento** (ad es., PA-**123456**.***01*** per i terreni su piastra e BA-**123456**.***01*** per quelli in flacone), oltre alla **data di revisione** (mese e anno). Il numero e la versione del documento sono inoltre ripetuti nel **piè di pagina** di ciascuna pagina.

In seguito viene citato il **nome prodotto**. Alcuni documenti di **Istruzioni per l'uso** contengono le descrizioni di vari terreni con formulazioni e applicazioni simili.

USO PREVISTO
È indicato il settore di applicazione. In caso di altri applicazione, il terreno o la procedura devono essere convalidati dall'utente.

BD Diagnostic Systems non si assume alcuna responsabilità se il prodotto viene usato per applicazioni, microorganismi o procedure non raccomandate nelle **Istruzioni per l'uso**.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA
In questa sezione è indicato il principio del metodo (“Metodo mcrobiologico”). Inoltre vengono fornite informazioni relative alla storia dello sviluppo del terreno, i principi della procedura e il funzionamento degli ingredienti elencati in **REAGENTI**.

REAGENTI
Questa sezione contiene la formula e il pH del prodotto.

Nella tabella della formula, le quantità degli ingredienti [g, mg, µg, mL, IU, U, ecc.] sono citate una sola volta, vengono citate di nuovo solo se sono cambiate. Segue un **esempio**:

BD CHROMagar O157
Formula* per litro di acqua purificata

Cromopeptone	22,0 g	
Cloruro di sodio	5,0	←***quantità in [g]***
Tellurito di potassio	2,5 mg	
Cefixime	0,05	← ***quantità in [mg]***
Cefsulodina	4,0	← ***quantità in [mg]***
Speciale miscela cromogena e selettiva	1,0 g	
Agar	12,0	← ***quantità in [g]***

pH: 7,1 ± 0,2

PRECAUZIONI

Se è presente l'etichetta IVD, i terreni **BD** pronti all'uso o parzialmente completati sono per uso diagnostico *in vitro*, come definito dalla direttiva europea relativa a tali dispositivi.[1] Possono altresì essere utilizzati in altri campi della microbiologia, come indicato per i rispettivi prodotti.
Questi prodotti sono esclusivamente per uso professionale e devono essere utilizzati soltanto da personale addestrato o che dispone di conoscenze adeguate. Non devono essere utilizzati autonomamente dai pazienti.
I prodotti indicati con "Per uso di laboratorio" possono essere utilizzati solo in microbiologia generale o industriale, biotecnologie, igiene generale e non devono essere impiegati per il trattamento di campioni clinici umani.

Non usare i prodotti che presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni cromatiche, essiccamento, fissurazioni o altri segni di deterioramento.

Osservare le norme asettiche per il trattamento di campioni e prodotti prima, durante e dopo l'uso.

Sicurezza chimico-biologica del prodotto
Questa sezione può inoltre contenere informazioni relative a pericoli di tipo chimico e/o biologico, indicati dai relativi simboli, unitamente alle relative diciture R (rischio) ed S (sicurezza).[2]

Per quanto riguarda i rischi originati dai materiali di origine animale, **BD** si impegna ad approvvigionarsene da Australia, Nuova Zelanda e Stati Uniti. In nessuno di questi paesi sono stati riscontrati casi di BSE (encefalopatia spongiforme bovina) nel bestiame nativo. **BD** si approvvigiona inoltre di materiali di origine animale in altri paesi [ad es., Argentina, Brasile, Colombia, Messico, Sud Africa e Uruguay]. In nessuno di questi altri paesi sono stati riscontrati casi di BSE nel bestiame nativo.

Rischi biologici originati da campioni e microorganismi posti in coltura su terreni microbiologici
Durante tutte le procedure, seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. I campioni e le colture di microorganismi devono essere trattati in base alle linee guida e alla norme di legge locali che disciplinano il rischio biologico. In base alla direttiva europea 2000/54/CE, la maggior parte degli agenti patogeni batterici e fungini fanno parte del gruppo di rischio 2. È stato creato il gruppo di rischio 3**, che comprende *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* enteroemorragica (EHEC; nota anche come STEC = *E. coli* Shiga produttrice di tossina), *Shigella dysenteriae* (tipo 1) oltre a molti altri batteri e funghi. Fra gli altri agenti patogeni batterici e fungini, tutte le specie di *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. ulcerans* e *Histoplasma capsulatum* appartengono al gruppo di rischio 3. Per ulteriori informazioni consultare l'allegato III della direttiva 2000/54/CE.[3] È possibile accedere a questa e ad altre direttive europee dal sito **www.europa.eu/index.htm**.

Smaltimento del prodotto
Dopo l'uso, prima dell'eliminazione, i contenitori dei campioni e tutto il materiale contaminato, compresi i terreni di coltura usati e i contenitori di coltura contaminati, devono essere sterilizzati in autoclave per 20 – 30 min a una temperatura di 121 °C o superiore (se si devono sterilizzare grandi volumi di materiali da smaltire) oppure inceneriti seguendo procedure convalidate.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

I terreni **BD** su piastra pronti all'uso devono essere conservati a 2 – 8 °C. I terreni in flacone e su dip slide devono essere conservati a temperature uguali o diverse.

La temperatura di conservazione è indicata, oltre che nel documento **Istruzioni per l'uso** specifico, anche sull'etichetta o sulla confezione del prodotto.

Evitare congelamento e surriscaldamento.

Il congelamento può causare il completo deterioramento dei gel di agar e la precipitazione dei terreni liquidi. L'esposizione a temperature superiori alla temperatura di conservazione indicata per un periodo di tempo più lungo possono dare luogo al deterioramento degli ingredienti dei terreni. Ciò è vero in particolare per gli agenti selettivi, ad esempio gli antimicrobici.
Dopo l'esposizione a cambiamenti di temperatura estremi e successivi (ad es., da 2 °C a 25 °C e poi di nuovo a 2 °C) su tutti i terreni di coltura solidi può prodursi un'eccessiva umidità dovuta alla condensa.
I terreni su piastra con un'eccessiva umidità devono essere asciugati prima dell'inoculazione, ad es. inserendoli in un incubatore con i coperchi semiaperti a 30 – 37 °C per non più di un'ora. Non essiccare i terreni! Il tempo di esposizione esatto dipende dall'umidità dell'aria all'interno dell'incubatore.

È inoltre indicata la **conservazione della confezione aperta**. La conservazione di terreni su piastra aperti indicata si riferisce alla refrigerazione in un luogo pulito.

Si deve evitare la contaminazione in fase di conservazione, ad esempio inserendo le piastre in buste di plastica pulite.

Per la conservazione dei terreni in flacone da imballaggi aperti vale la vita utile indicata sull'etichetta della confezione e sui flaconi, purché questi ultimi non siano stati aperti.

Tutti i terreni pronti all'uso o parzialmente completati devono essere conservati al buio.

Se i terreni vengono esposti a luce artificiale, solare o UV per un periodo prolungato, le loro prestazioni potrebbero risultare inferiori. Vari terreni, ad es. i terreni cromogeni, agar Endo e altri, sono particolarmente sensibili alla luce di forte intensità prima e durante l'incubazione.

Tutti i terreni **BD** pronti all'uso o parzialmente completati possono essere usati fino alla data di **scadenza** e incubati per i tempi di incubazione raccomandati.

È ad esempio possibile inoculare un terreno micobatterico il giorno della sua scadenza e far seguire all'inoculazione un'incubazione di 4 – 6 settimane. Evitare l'essiccamento del terreno durante l'incubazione.

La data di scadenza (simbolo della clessidra) è indicata sui singoli contenitori e sull'etichetta della confezione. Per tutti i prodotti viene utilizzato il formato di data Anno-Mese-Giorno, ad es., 2004-06-09 indica il 9 giugno 2004.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Le procedure di controllo di qualità indicate nelle **Istruzioni per l'uso** devono essere eseguite dall'utente. I ceppi per il test indicati, di solito, ma non sempre, corrispondono ai ceppi utilizzati nelle procedure di controllo qualità per il test di rilascio da parte del produttore, nell'ambito del quale possono essere utilizzati altri ceppi di provocazione. Di solito vengono utilizzati ceppi dell'American Type Culture Collection (= ATCC; **www.atcc.org**), ma anche campioni di raccolte europee, ad es., della Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (= DSM; **www.dsmz.de**), o della National Collection of Type Cultures (= NCTC; **www.hpacultures.org.uk**).

Consultare il **Certificato di analisi** del relativo lotto di prodotti, nel quale sono indicati la batteria di ceppi effettivamente usata per il test e i risultati ottenuti per il rilascio del lotto.

Le procedure per l'esecuzione di un test microbiologico delle prestazioni possono dipendere dal tipo di terreno e dal metodo seguito.

Utilizzare sempre sospensioni fresche di ceppi per il test, preparate da colture incubate durante la notte in un terreno liquido adatto (ad es., brodo di soia triptico o **Trypticase** per gli organismi aerobi e brodo Schaedler con emina e vitamina K per gli organismi anaerobi). In alternativa è possibile utilizzare sospensioni fresche preparate da colture incubate durante la notte in terreni su piastra. I tempi di incubazione e precoltura devono essere prolungati se la crescita dei ceppi per il test si dimostra lenta.
Per **sottoporre a test la capacità nutritiva di un terreno su piastra** in base allo standard M22-A2 del NCCLS, diluire la sospensione dell'inoculo in modo da ottenere 1 – 2 x 10^4 UFC per piastra.[4] Se così non si ottengono colonie isolate, usare un inoculo alleggerito di dieci volte. In base alla norma DIN EN 12322, le proprietà che promuovono la crescita vengono sottoposte a test con 100 – 1000 UFC o una quantità sufficiente di UFC per dar luogo a colonie isolate mediante una tecnica appropriata di striscio della piastra.[5] Se i ceppi vengono inoculati mediante una tecnica quantitativa, 50 – 500 UFC per piastra sono di solito sufficienti per ottenere un numero di colonie di cui è possibile effettuare la conta. In base alle linee guida USP ad EP, si devono utilizzare 10 – 100 UFC per piastra (o contenitore).[6,7]

Per **sottoporre a test la capacità di inibizione di un terreno selettivo su piastra**, in base allo standard M22-A2 del NCCLS, per l'inoculazione devono essere utilizzati 1 – 2 x 10^5 UFC per piastra e in base alla norma DIN EN 12322 circa 10^4 o più UFC.[4,5] Un inoculo molto elevato di ceppi indesiderati può dare luogo a un "sovraccarico" del terreno e portare alla crescita di contaminanti.
Includere sempre per il confronto un terreno di riferimento per la crescita che deve sempre essere un terreno non selettivo in grado di fornire una crescita ottimale di tutti i ceppi per il test. Per i ceppi aerobi utilizzare **Columbia Agar with 5% Sheep Blood**, nel caso di ceppi esigenti (come la *Neisseria gonorrhoeae*) agar cioccolato, per gli anaerobi **Schaedler Agar with Vitamin K and 5% Sheep Blood** e per i funghi **Sabouraud Glucose Agar**.
In base al test quantitativo, la crescita dei ceppi "desiderati" sul terreno utilizzato per il test deve risultare pari ad almeno il 70% rispetto al terreno di riferimento. Sui terreni selettivi la crescita dei ceppi "indesiderati" deve essere da parzialmente a completamente inibita. Il grado di inibizione

dipende dal terreno e dai ceppi, ma la crescita è di solito ridotta di un fattore pari a 10^3-10^4 (o più) in confronto alla crescita ottenuta sul terreno di coltura di riferimento non selettivo.
Per sottoporre a test le **prestazioni di crescita di terreni in fiale o flacone** si utilizzano metodi paragonabili. Le provette e i flaconi più piccoli devono essere inoculati con 10^5 UFC in base allo standard M22-A2 del NCCLS.[4] Per le procedure EP, USP e DIN EN 12322 sono necessari gli stessi inoculi sopra descritti per i terreni su piastra.[5-7] Per i flaconi con volumi di aspirazione superiori a 10 mL è necessario eseguire dapprima aliquote di 5 o 10 mL in provette sterili e quindi possono essere sottoposti a test nello stesso modo.

Incubare e ispezionare il terreno inoculato come descritto nel rispettivo prodotto.

Determinare il **pH** mediante potenziometria a temperatura ambiente (25° C) per verificare che rientri nei valori specificati per il prodotto. L'intervallo del pH indicato nel documento **Istruzioni per l'uso** è stato determinato dopo la produzione del terreno. Può variare leggermente in base alla vita utile e può dipendere dal sistema di elettrodi utilizzato.

La **sterilità del prodotto** può essere sottoposta a test da parte dell'utente incubando varie piastre (o contenitori, ad es. flaconi) a una temperatura di incubazione adatta (ad es., 28 – 35 °C) per 5 – 7 giorni o secondo necessità per le procedure da seguire.[6,7]

Per i terreni liquidi naturalmente torbidi, dopo l'incubazione è necessario effettuare una subcoltura su un terreno solido adatto (ad es., piastre con agar soia **Trypticase**) per determinare la sterilità. Inoltre, in caso di dubbio possono essere utili la colorazione di Gram e l'esame microscopico.

PROCEDURA

In **Materiali forniti** sono descritti il terreno e il tipo di contenitore. La maggior parte dei terreni di coltura **BD** su piastra pronti all'uso sono forniti su piastre impilabili **BD Stacker** da 90 mm, progettate in modo da essere interbloccabili per ridurre al minimo le possibilità di scivolamento. Alcuni terreni di coltura **BD** su piastra pronti all'uso sono forniti su piastre di tipo diverso, ad esempio suddivise (= piastre doppie), a contatto, da 150 mm o quadrate, a seconda dell'applicazione.
I terreni di coltura **BD** pronti all'uso o parzialmente completati in flacone sono disponibili in diversi formati, volumi di aspirazione e con diverse chiusure, a seconda del loro utilizzo e applicazione.
Sono inoltre fornite informazioni sullo stato microbiologico del prodotto:

I terreni su piastra, dip slide e alcuni terreni in flacone sono asettici, ossia “microbiologicamente controllati”. Per questi terreni, lo standard DIN EN 12322 consente un tasso di contaminazione pari a $\leq$ 5%.[5] I criteri di rilascio interni sono tuttavia più restrittivi.
I terreni in flacone sono sterilizzati nel contenitore finale ed etichettati con il simbolo di “sterile”, unitamente al simbolo del “termometro” (che indica la sterilizzazione in autoclave). Per questi terreni si applicano i criteri EP per la sterilità.[6]

In **Materiali non forniti** sono indicate le attrezzature speciali necessarie per eseguire il test. I normali materiali, ad es., anse per l'inoculazione, sistemi di striscio, pipettatori, incubatori, ecc. non sono indicati, in quanto sono sempre presenti in un laboratorio microbiologico.

In **Tipi di campioni** sono indicati i campioni che possono essere utilizzati con il terreno specifico. Se necessario, in **Prelievo e trasporto** sono forniti requisiti speciali per la raccolta e il trasporto dei campioni**.**

> I campioni devono essere prelevati e trasportati in maniera corretta, utilizzando terreni di trasporto adatti per evitare l'essiccazione, un'eccessiva esposizione all'ossigeno o la crescita eccessiva di organismi commensali. Inoltre è importante il tempo che intercorre fra il prelievo e il trattamento dei campioni in laboratorio, che deve essere il più possibile breve. Per ulteriori informazioni sui metodi di trasporto di patogeni specifici, consultare la documentazione appropriata.[8]

In **Procedura del test** sono riportate informazioni generali e specifiche relative all'inoculazione del terreno specifico e, se necessario, all'utilizzo di altri terreni.

> **Inoculazione del terreno**
> È buona pratica di laboratorio in microbiologia fare in modo che l'inoculazione dei terreni con il campione venga eseguita mediante striscio se lo scopo è l'isolamento, effettuando lo striscio in tre fasi su ogni piastra con un'ansa che viene risterilizzata prima di ogni fase. Se si utilizzano anse presterilizzate, usare un'ansa diversa per ciascuna delle fasi di striscio. Se il materiale viene posto in coltura direttamente da un tampone, passare il tampone su una piccola area del bordo e strisciare con le anse dalla zona inoculata per isolare le colonie, effettuando lo striscio in due fasi.
> Questa tecnica consente l'isolamento di singole colonie da colture miste. Per i test di identificazione e suscettibilità degli isolati è necessario utilizzare colture pure ottenute da colonie singole.

In questa sede sono inoltre indicati il tempo e la temperatura di incubazione.

> È buona pratica di laboratorio verificare con regolarità la **temperatura effettiva degli incubatori.** Temperature inferiori e superiori all'intervallo indicato possono portare a una perdita dell'integrità cellulare degli organismi nelle colture, crescita ridotta o risultati non riproducibili.
> Durante l'incubazione dei terreni su piastra pronti all'uso, fornire un'**umidità** adeguata, soprattutto se i tempi di incubazione sono lunghi. In tal caso non utilizzare incubatori a circolazione d'aria, in quanto i terreni potrebbero essiccarsi notevolmente, soprattutto se l'aria all'interno del laboratorio è secca. Le colture su piastra di microorganismi adattati ad ambienti umidi, ad es. la *Legionella,* devono essere incubate in camere o recipienti umidificati. Le piastre possono essere sigillate con nastro adesivo per ridurre l'evaporazione. Tuttavia deve comunque essere possibile un minimo scambio gassoso.
> Ciò vale anche per i terreni in provetta: i tappi a vite devono sempre essere leggermente allentati durante l'incubazione.

Nella sezione **Risultati** sono riportate informazioni sull'aspetto degli organismi sul terreno specifico. Per terreni di crescita e isolamento generici, non è possibile fornire informazioni specifiche per tutti gli organismi in grado di crescere sul terreno. Consultare la documentazione appropriata.[9]
Infine in **Calcolo e interpretazione dei risultati** sono fornite informazioni specifiche Questa sezione è presente se la diagnosi dipende dalla quantità degli agenti patogeni presenti nel campione. Ad esempio, ciò è valido per terreni come l'agar CLED, utilizzato per la conta dei batteri nelle urine.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Vengono descritte le prestazioni del terreno e, se pertinente, i tipi di organismi che è possibile isolare, vengono inoltre citate le fonti. In questa sezione possono essere inclusi i risultati di studi di valutazione delle prestazioni se i terreni sono nuovi o di recente introduzione.

> Occorre sottolineare che un solo terreno è raramente adatto a rilevare tutti i microrganismi potenzialmente significativi in un campione. All'interno di una popolazione microbica possono inoltre esistere singoli ceppi che non crescono adeguatamente su un determinato terreno nonostante questo sia adatto alla rilevazione della maggior parte dei ceppi appartenenti a tale specie. Pertanto, per la maggior parte dei campioni si procede ad inoculare contemporaneamente due o tre terreni diversi oppure un terreno non selettivo viene unito a uno o due terreni selettivi o, ancora, si usano due terreni selettivi con un diverso grado di selettività.

In questa sede sono inoltre riportate le **limitazioni di applicazione** del terreno.
Per la maggior parte dei terreni sono necessari ulteriori test per ottenere l'identificazione finale degli organismi isolati.

BIBLIOGRAFIA

Sono indicate le pubblicazioni citate nel documento.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

Sono indicati i **numeri di catalogo**, le **dimensioni delle confezioni** disponibili e, se pertinente, i diversi formati.

ULTERIORI INFORMAZIONI

Sono fornite ulteriori informazioni, fra cui l'indirizzo del produttore (simbolo della fabbrica). Infine sono citati i marchi commerciali indicati nei documenti specifici.

BIBLIOGRAFIA DEL PRESENTE DOCUMENTO DI ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO

1. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal L 331 , 07.12.1998, p. 0001 - 0037
2. Directive 67/548/EEC of the European Parliament and of the Council of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances Official Journal P 196, 16.08.1967, p. 0001 – 0098.
3. 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 98/391/EEC). Official Journal L 262, 17.10.2000, p. 0021-0045.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Standard M22. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Wayne, PA, USA. *Search for latest version at* **www.clsi.org**
5. DIN EN 12322. 1999. Culture media for microbiology – performance criteria for culture media. Beuth Verlag Berlin.
6. Council of Europe. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France. *Search for latest version at* **www.pheur.org**
7. U.S. Pharmacopeial Convention. The U.S. Pharmacopeia /The national formulary. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. *Search for latest version at* **www.uspnf.com**
8. Thomson, R.B. 2007. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.

9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD
© 2009 Becton, Dickinson and Company