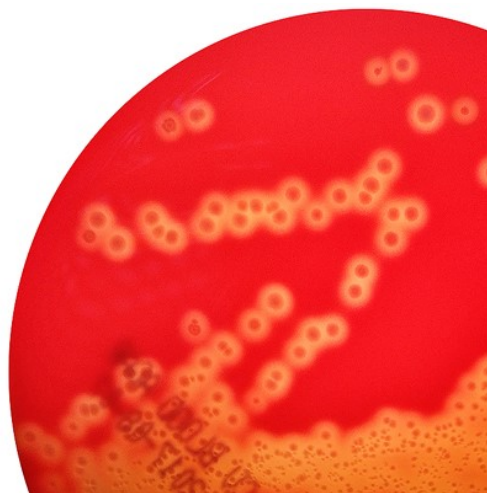


**ISTRUZIONI PER L'USO****COLUMBIA CNA BLOOD AGAR****Piastre pronte all'uso**Columbia CNA Blood Agar:
Streptococco β -emolitico di gruppo A**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo, con sangue defibrinato di montone per l'isolamento dei cocchi Gram positivi da campioni clinici e da altri materiali contenenti flora mista e per la determinazione dell'emolisi batterica.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptocomplex	10 g
Triptosio	10 g
Peptone	3 g
Amido di mais	1 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	12 g
Acido nalidissico	15 mg
Colistina	10 mg
Sangue defibrinato di montone	50 mL
Acqua purificata	1000 mL

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'agar sangue Columbia con 10 mg/L di colistina e 15 mg/L di acido nalidissico fu descritto per la prima volta nel 1966 da Ellner, Stoessel, Drakeford e Vasi¹ della Columbia University, che combinarono in unico terreno peptoni di carne e caseina, antibiotici e sangue defibrinato di montone per l'isolamento dei cocchi Gram positivi. Dopo 2 anni di sperimentazione, gli autori riportarono che il terreno permise di ottenere risultati superiori per la crescita e la differenziazione microbica basata sull'emolisi, rispetto alle basi per agar sangue precedentemente in uso.¹

Columbia CNA Blood Agar è un terreno selettivo indicato per l'isolamento e la determinazione delle proprietà emolitiche dei cocchi Gram positivi (*Staphylococcus* e *Streptococcus*), soprattutto nell'esame di campioni contaminati da flora Gram negativa (es. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*) che tende a sovra crescere nei terreni al sangue convenzionali non selettivi.^{2,3}

I peptoni forniscono azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno; l'amido di mais, oltre ad essere una fonte di energia per la crescita microbica, ha la funzione di assorbire i sotto-prodotti tossici contenuti nei campioni. La presenza del sangue defibrinato di montone permette una preliminare differenziazione batterica sulla base del tipo di emolisi espressa. La colistina, antibiotico polipeptidico del gruppo delle polimixine e l'acido nalidissico, un chinolone di prima generazione, sono attivi nei confronti dei batteri Gram negativi, rendendo il terreno selettivo per i cocchi Gram positivi.

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	rosso-sangue, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,3 \pm 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Columbia CNA Blood Agar CND: W0104010405; EDMA: 14.01.04.01; RDM: 1443989/R	Piastre pronte all'uso	541361	2 x 10 piastre \varnothing 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, materiali per la generazione di una atmosfera di incubazione controllata, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Le piastre di Columbia CNA Blood Agar possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici umani raccolti da siti normalmente non sterili quali l'orecchio, le vie aeree superiori, il tratto genitale, pus ed essudati.^{4,5} Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.⁴

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.

Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate, assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare a 35-37 °C in aerobiosi o in atmosfera al 5-10% di CO₂ ed osservare dopo 18-24 e 48 ore.





9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie e delle aree di emolisi. Di seguito sono riepilogate le caratteristiche delle colonie di alcuni microrganismi che si possono rinvenire sulle piastre di Columbia CNA Blood Agar.⁶

- Le colonie degli Streptococchi del gruppo A hanno in genere un diametro di circa 0,5 mm, sono trasparenti o traslucide e a cupola, con una superficie liscia e un bordo intero. Sono circondate da una zona ben definita di emolisi completa del sangue (β -emolisi), di solito ampia due o tre volte il diametro della colonia.
- Le colonie degli streptococchi di gruppo B sono generalmente più grandi (1-2 mm di diametro) circondate da una zona più piccola di emolisi completa; alcuni ceppi non lisano affatto il sangue.
- L'aspetto delle colonie degli Streptococchi del gruppo C e del gruppo G non differiscono in modo sufficiente da quello delle colonie del gruppo A per avere un valore nell'identificazione.
- Le colonie degli Streptococchi di gruppo D (*S.bovis*) sono leggermente più grandi delle colonie degli altri streptococchi, sono meno opache, sono sollevate con colore da grigio a grigio-bianco e non sono emolitiche.
- Le colonie di Pneumococchi sono rotonde con bordi interi, mucoidi, di circa 0,5-1 mm di diametro; con incubazione in CO₂, sono circondate da una zona abbastanza grande di α -emolisi.
- Le colonie degli Streptococchi *viridans* variano di dimensioni da piuttosto minuscole ad una dimensione simile o maggiore di quella degli Streptococchi del gruppo A. Le colonie sono generalmente più piccole di quelle pneumococciche. Possono apparire mucoidi, traslucide o lucide e non traslucide. Le colonie possono essere circondate da una piccola zona di α -emolisi o non avere alcuna zona di emolisi.
- Le colonie degli Stafilococchi sono gialle o bianche con o senza la zona di β -emolisi.

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.⁷

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	35-37°C / 18-24H / A o CO ₂	buona crescita, β -emolisi
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	35-37°C / 18-24H / A o CO ₂	buona crescita, α -emolisi
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 18-24H / A o CO ₂	buona crescita
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	35-37°C / 44-48H / A o CO ₂	totalmente o parzialmente inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di Columbia CNA Blood Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Columbia CNA Blood Agar Base REF 4011361 addizionato di sangue defibrinato di montone) sono testati per la produttività, la selettività e per l'emolisi, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.pyogenes* ATCC 12384, *S. pneumoniae* ATCC 6305, *S.agalactiae* ATCC 12386, *S.agalactiae* ATCC 13813, Group C *Streptococcus* ATCC 12388, *S.aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 h ore in aerobiosi si osservano le caratteristiche emolitiche dei ceppi e l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano emolisi tipiche e buone crescite.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 di ceppi non-target: *E.coli* ATCC 25922, *P.mirabilis* ATCC 10005, *P.mirabilis* ATCC 12453, *P.aeruginosa* ATCC 14207. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48 ore in aerobiosi la crescita dei ceppi non target risulta completamente inibita alla diluizione 10⁻¹.

12 - LIMITI DEL METODO

- A causa della presenza di carboidrati (amido) le zone di beta emolisi possono essere circondate da un piccolo alone più scuro, apparentemente di alfa emolisi.³
- La crescita ed il tipo di emolisi sul terreno qui descritto dipendono dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo; è possibile che alcuni ceppi non siano in grado di coltivare sul terreno e/o dimostrino modelli emolitici diversi dall'atteso.
- I lieviti ed alcuni batteri Gram negativi resistenti alla miscela antibiotica CNA potrebbero non essere inibiti su questo terreno.
- Poiché alcuni agenti patogeni richiedono anidride carbonica per una crescita ottimale, è preferibile incubare le piastre con il 5-10% di CO₂.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se richiesto e pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.





- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Ellner PD, Stoessel CJ, Drakeford E, Vasi, F. A new culture medium for medical bacteriology. Am. J. Clin. Path 1966; 45: 502-504.
2. Atlas D, Snyder J. Media Reagents and Stains. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.345.
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
5. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
6. Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg H.D. and Shadomy, H.J. (ed) (1991) In Manual of Clinical Microbiology, 5th edition, Washington, DC: American Society for Microbiology; 1991.
7. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

