



ISTRUZIONI PER L'USO

MODIFIED THAYER MARTIN (MTM) MEDIUM**Piastre pronte all'uso**

MTM Medium:
Neisseria gonorrhoeae

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo ed arricchito per l'isolamento e la coltivazione di *Neisseria gonorrhoeae* da campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

| | |
|---|-----------|
| Peptocomplex | 15 g |
| Amido di grano | 1 g |
| Dipotassio idrogeno fosfato | 4 g |
| Potassio diidrogeno fosfato | 1 g |
| Sodio cloruro | 5 g |
| Agar | 12 g |
| Sangue defibrinato di montone scaldato a 80°C | 50 mL |
| Acqua purificata | 1000 mL |
| VCNT Supplement | |
| Vancomicina | 3,0 mg |
| Colistina | 7,5 mg |
| Nistatina | 12.500 IU |
| Trimetoprim | 5,0 mg |
| Biovitex Enrichment Supplement | |
| Nicotinamide Adenin Dinucleotide (NAD) | 2,50 mg |
| Cocarbossilasi | 1,00 mg |
| Acido p-aminobenzoico | 0,13 mg |
| Tiamina | 0,03 mg |
| Vitamina B12 | 0,10 mg |
| L-glutammina | 100,00 mg |
| L-cistina | 11,00 mg |
| L-cisteina HCl | 259,00 mg |
| Adenina | 10,00 mg |
| Guanina HCl | 0,30 mg |
| Ferro nitrato.6H ₂ O | 0,20 mg |
| Glucosio | 1,00 g |

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nel 1964 Thayer e Martin¹ formularono un terreno selettivo per la coltivazione di *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, incorporando nel GC Agar emoglobina, yeast supplement B, polimixina B e ristocetina. Thayer e Martin migliorarono nel 1966² la loro precedente formulazione sostituendo gli antibiotici originali con vancomicina, colistina e nistatina (VCN). Nel 1970 Martin e Lester³ modificarono il terreno Thayer-Martin aumentando il contenuto di agar e di glucosio e incorporando un ulteriore antibiotico, il trimetoprim lattato; questo terreno fu chiamato Modified Thayer-Martin (MTM)

Il terreno Biolife Modified Thayer-Martin (MTM) Medium è preparato con GC Medium Base, addizionato con sangue defibrinato di montone cioccolattizzato a 80 ° C per 15 minuti ed i supplementi Biovitex e VCNT.

Il sangue defibrinato di montone, lisato a caldo, è una buona fonte sia di emina (fattore X) sia di NAD (fattore V), composti che stimolano la crescita di *Neisseria*⁴. Il fattore V e vari altri fattori come glutammina, coccarbossilasi, cistina ecc., favoriscono la crescita di *N.gonorrhoeae*⁵, sono forniti dal supplemento di arricchimento chimicamente definito Biovitex.

La vancomicina inibisce la crescita dei batteri Gram-positivi, la nistatina è un agente antifungino, la colistina inibisce la flora microbica Gram-negativa e quasi tutte le *Neisserie* saprofiti, il trimetoprim sopprime la sciamatura di *Proteus*.⁵

Peptocomplex fornisce carbonio, azoto ed oligoelementi per la crescita batterica, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico, i fosfati tamponano il terreno prevenendo modifiche del pH dovute alla produzione di ammine, l'amido di mais è incluso per assorbire i sottoprodotti tossici contenuti nel campione ed è una fonte di energia per la crescita batterica.⁵

Il Modified Thayer-Martin (MTM) Medium è destinato all'isolamento e alla coltivazione di *N. gonorrhoeae* da campioni clinici contenenti una flora mista di batteri e/o funghi.⁵⁻⁸

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

| | |
|----------------------|----------------|
| Aspetto | marrone, opaco |
| pH finale a 20-25 °C | 7,2 ± 0,2 |

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|--|------------------------|--------|---|
| Modified Thayer-Martin (MTM) Medium CND: W0104010405, EDMA: 14.01.04.01, RDM: RDM: 444712/R | Piastre pronte all'uso | 541522 | 2 x 10 piastre ø 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 con CO₂ o incubatore a CO₂ con umidificatore, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.





7 – CAMPIONI

Le piastre di Modified Thayer Martin (MTM) Medium possono essere inoculate direttamente con campioni clinici umani raccolti da siti contaminati da flora mista, batterica e/o fungina (tratto urogenitale, vie aeree superiori, pus ed essudati).⁸⁻¹¹

Il terreno non è adatto per l'isolamento di *Neisseria* da siti supposti sterili quali il liquor, il tampone congiuntivale, le biopsie cutanee, il liquido articolare.⁵ Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio (GLP) per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici. Consultare la letteratura appropriata poiché *Neisseria* è molto sensibile alle procedure di raccolta e di conservazione.⁵

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. La superficie dell'agar deve essere liscia ed umida, ma senza una eccessiva quantità di acqua. Seminare il campione il più presto possibile dopo che è stato ricevuto in laboratorio per evitare la perdita di vitalità dei gonococchi e la crescita eccessiva di contaminanti.

Inoculare pesantemente con il materiale ruotando il tampone su un quadrante della piastra, quindi strisciare sugli altri tre quadranti per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate, assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa eseguire una semina a forma di una larga "Z" con il tampone di raccolta del campione, per scaricare il più possibile il materiale quindi, con un'ansa sterile, strisciare incrociando la "Z".

Incubare le piastre inoculate a 35-36,5°C in atmosfera umida con il 3-7% di CO₂. Esaminare le piastre dopo 24 e 48 ore e, se necessario dopo 72 ore.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

Le colonie di *N.gonorrhoeae* sono di dimensioni variabili, di solito piccole (0,5-2 mm), moderatamente convesse, sollevate, granulari, luccicanti, umide, con margini interi o lobati, di solito da bianco grigiastro a traslucido; quasi tutti i ceppi diventano mucoidi dopo 48 ore.

Sulle colonie sospette eseguire la colorazione di Gram per confermare la presenza di diplococchi uniformi Gram negativi ed il test dell'ossidasi (+).

10 - CONTROLLO QUALITA' 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.⁹

| CEPPI DI CONTROLLO | INCUBAZIONE T° / T / ATM | RISULTATI ATTESI |
|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| <i>N.gonorrhoeae</i> ATCC 43069 | 35-36,5°C / 24-48H / CO ₂ | buona crescita |
| <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228 | 35-36,5°C / 24-48H / CO ₂ | inibito |
| <i>P.mirabilis</i> ATCC 43071 | 35-36,5°C / 24-48H / CO ₂ | inibito |
| <i>C.albicans</i> ATCC 60193 | 35-36,5°C / 24-48H / CO ₂ | parzialmente inibito |

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 Modified Thayer Martin (MTM) Medium e delle materie prime impiegate per la produzione (terreno in polvere GC Medium Base REF 401520, addizionato di VCNT, REF 4240008, Biovitex REF 4240009 e sangue cotto di montone) sono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento. La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con 2 ceppi target: *N.gonorrhoeae* ATCC 43069, *gonorrhoeae* ATCC 19424. Dopo incubazione a 35-36,5°C per 24-48 ore in atmosfera con 3-7% di CO₂ si osserva l'entità delle crescite. Tutti i ceppi mostrano buone crescite con morfologia tipica. 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: *N.sicca* ATCC 9913, *S.epidermidis* ATCC 12228, *E.coli* ATCC 25922, *P.mirabilis* ATCC 43071, *C.albicans* ATCC 60193. Dopo incubazione a 35-36,5°C per 24-48 ore in atmosfera con 3-7% di CO₂ la crescita di *S.epidermidis*, *E.coli*, *P.mirabilis* risulta completamente inibita alla diluizione 10⁻¹, la crescita di *N.sicca* e di *C.albicans* risulta parzialmente inibita.

12 - LIMITI DEL METODO

- A volte, nel terreno può essere osservata la presenza di piccole particelle. Questo fenomeno non influisce sulle prestazioni del terreno.
- Sono stati segnalati dal 3% al 10% di ceppi sensibili alla vancomicina appartenenti ad alcuni auxotipi di *N.gonorrhoeae*, che non sviluppano crescita sul terreno^{13,14}, così come è stata segnalata l'esistenza di ceppi sensibili al trimetoprim¹⁵. Per l'isolamento delle neisserie patogene, al fine di evitare la perdita dei ceppi sensibili alla vancomicina e/o al trimetoprim, si raccomanda di utilizzare, abbinato al MTM medium, un terreno non selettivo, quale l'agar cioccolato.⁵
- MTM medium non è indicato per l'isolamento di *Neisseria* spp. da siti supposti sterili come il liquor, il tampone congiuntivale, le biopsie cutanee, il liquido articolare, per i quali sono raccomandati terreni non selettivi.⁵
- Per la crescita di *N.gonorrhoeae* è necessario che la superficie delle piastre sia umida; se appare secca, umidificare con alcune gocce di acqua distillata sterile. Posizionare una garza umida o salviette di carta nel contenitore di incubazione in CO₂ o utilizzare un termostato con umidificatore.
- Su questo terreno *N.gonorrhoeae* cresce con colonie più piccole e più granulari rispetto all' agar cioccolato non selettivo.
- Su questo terreno possono crescere microrganismi saprofiti, resistenti agli antimicrobici presenti. Ad esempio *N. lactamica* può crescere con colonie più piccole e meno umide dei Gonococchi, occasionalmente con una tinta giallastra⁵
- Per la raccolta dei campioni utilizzare tamponi di dacron o di alginato di calcio, evitare i tamponi di cotone poiché contengono acidi grassi che sono inibitori di *N.gonorrhoeae*.
- I gonococchi sono tra i batteri Gram negativi più fragili. Inoculare qualsiasi campione sospetto di contenere *Neisseria* sul terreno di isolamento primario immediatamente al momento del prelievo per evitare qualsiasi perdita di vitalità e/o crescita eccessiva di contaminanti; se ciò non fosse possibile, i tamponi di *N.gonorrhoeae* devono essere mantenuti a 4-6°C per non più di 3 ore.⁵
- La temperatura dell'incubatore deve essere impostata a 35-36,5°C⁶ poiché molti ceppi di *N.gonorrhoeae* non crescono bene a 37°C⁵.
- Esaminare le piastre dopo 24 ore di incubazione. A 48 ore la morfologia Gram può presentare forme atipiche.
- Molti protocolli standard^{4,7,8,10} descrivono l'impiego del terreno MTM per individuare i portatori di meningococco, con tamponi orofaringei e rinofaringei. Questa applicazione non è prevista dalla destinazione d'uso del terreno Biolife MTM Medium. L'utente finale deve convalidare questa applicazione prima di utilizzare di routine il terreno MTM Medium per la determinazione di *N.meningitidis* nei campioni clinici umani.





- 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 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 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.
- 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 le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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

- Thayer JD, E. Martin Jr E. A selective medium for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Pub. Health Rep. 1964; 79:49.
- Thayer JD, E. Martin Jr E. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Pub. Health Rep. 1966; 81:559-562.
- Martin JE Jr, Lester A. Transgrow, a medium for transport and growth of *N. gonorrhoeae* and *N. Meningitidis*. HSMHA Health Service Rep. 1971: 86:30
- CDC Lab Manual, meningitides; Annex :Preparation of Media and Reagents, 2016
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- CDC: Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).Screening Tests To Detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Infections Recommendations and Reports. October 18, 2002 / Vol. 51 / No. RR-15
- Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
- Elias J, Frosh M, Vogel U. Neisseria. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015. p.635.
- 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.
- Public Health England: Standards for microbiology investigations (UK SMI)- Bacteriology : UK SMI B2:2017, UK SMI B9:2015, UK SMI B14:2016; UK SMI B28:2017; B51:2014
- Vandepitte J, Verhaegen J, P. Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd edition Geneva: World Health Organization Geneva; 2003.
- CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
- Talbot V. et al. Vancomycin sensitive penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. Br.J Ven Dis. 1983; 59:277
- Mirret S, Reller B, Knapp JS. *N. gonorrhoeae* strains inhibited by vancomycin in selective media and correlation with auxotype. J Clin Microbiol 1981; 14: 94
- Lai-King Ng, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005; 16(1): 15-25.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | |
|---------------------------|-------------------------------------|--|------------------|-----------------------------|
| REF Numero di catalogo | 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 |
| Rev.5 | Cap.10: Controllo qualità; Cap. 11: caratteristiche delle prestazioni | 03/2021 |

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

