



ISTRUZIONI PER L'USO

BORDETELLA SELECTIVE AGAR

Piastrre pronte all'uso

*Bordetella pertussis* su Bordetella Selective Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento di *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* da campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Estratto di carne	10,000 g
Peptone	10,000 g
Amido	10,000 g
Carbone vegetale	4,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Acido nicotinico	0,001 g
Agar	12,000 g
Cefalexina	0,040 g
Sangue defibrinato di cavallo	100 mL
Acqua purificata	900 mL

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La pertosse è una malattia altamente contagiosa causata da un coccobacillo Gram negativo, *B. pertussis*, che colonizza le vie respiratorie; *B. parapertussis* causa un'infezione simile alla pertosse ma meno grave di quella sostenuta da *B. pertussis*. Tra le specie del genere *Bordetella*, *B. pertussis* è la più esigente e con il tasso di crescita più lento; il suo sviluppo sui terreni di coltura è inibito da acidi grassi, ioni metallici, solfati e perossidi. L'isolamento di *B. pertussis* richiede un terreno contenente carbone che ha la funzione di legare i composti tossici.

Bordetella Selective Agar, noto anche come Regan Lowe Agar, è preparato secondo la formulazione descritta da Sutcliffe e Abbott¹ ed è costituito da Charcoal Agar Base, addizionato di sangue defibrinato di cavallo e cefalexina.

L'estratto di carne ed il peptone forniscono carbonio, azoto ed oligoelementi per la crescita batterica, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il carbone, insieme all'amido, neutralizza gli acidi grassi ed i perossidi, che sono tossici per *Bordetella*. Per favorire la crescita vengono aggiunti al terreno sangue di cavallo e acido nicotinico. La cefalexina sopprime parzialmente la crescita della normale flora nasofaringea, compresi i ceppi di *Haemophilus influenzae* resistenti alla penicillina, *Staphylococcus* e *Neisseria* spp.²

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto	nero, opaco
pH finale a 20-25 °C	7,4 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Bordetella Selective Agar CND: W0104010405, EDMA: 14.01.04.01; RDM: 1443252/R	Piastrre pronte all'uso	549905	2 x 10 piastrre 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, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Le piastrre di Bordetella Selective Agar possono essere inoculate direttamente con tampone pernasale, aspirato nasofaringeo, tampone nasofaringeo.³

Il tampone deve essere inserito bene nel rinofaringe, ruotato più volte e lasciato in posizione per 30-60 secondi.³ Il recupero ottimale si ottiene raccogliendo i campioni con tamponi di alginato di calcio o di poliestere sintetico con asta sottile e flessibile o mediante aspirazione; non si devono utilizzare tamponi di cotone perché contengono sostanze tossiche sulle fibre, come gli acidi grassi.⁴ Dopo la raccolta, il campione deve essere immediatamente inoculato in Bordetella Selective Agar o posto direttamente in un terreno di trasporto adatto, come Regan & Lowe transport medium.⁵ I terreni di trasporto generici non nutritivi, come il terreno Amies, devono essere utilizzati solo se contengono carbone ed il tempo di conservazione non supera le 24 ore.⁶ Applicare le buone pratiche di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici; se possibile, raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Consultare i riferimenti appropriati per ulteriori informazioni.^{3,4,6}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastrre a temperatura ambiente. 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 camera umida, in condizioni aerobiche, per 7 giorni, ed esaminare quotidianamente per la comparsa di colonie, morfologicamente coerenti con *Bordetella* spp.

Katzko et al.,⁷ hanno riportato un miglioramento del recupero di *Bordetella* spp. dai tamponi rinofaringei estendendo l'incubazione delle colture primarie in piastra oltre i consueti sette giorni fino a un totale di dodici giorni.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie. *B. pertussis* cresce con piccole colonie luccicanti, da bianche a grigie, simili a gocce.

Le colonie di *B. pertussis* potrebbero non essere visibili senza l'ausilio di un microscopio per 2-4 giorni.

Per prevenire la crescita eccessiva di contaminati diffondendo colonie o muffe, utilizzare un'ansa od un ago sterili per rimuovere le parti dell'agar che contengono questi contaminanti. Le piastre possono essere scartate come negative dopo 7 giorni di incubazione.

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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>B. pertussis</i> ATCC 9797	35-37°C / 44-48 H / A	buona crescita
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 44-48 H / A	inibito
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 44-48 H / A	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 Bordetella Selective Agar sono testati per la produttività e la selettività.

La produttività del terreno è valutata inoltre con metodo ecometrico semiquantitativo con i ceppi target *B. pertussis* ATCC 9797 e *B. parapertussis* ATCC 15311. Dopo incubazione a 35-37°C per 44-48 ore si osserva l'entità delle crescite: i due ceppi mostrano buone crescite.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con appropriate diluizioni decimali in soluzione salina di sospensioni con torbidità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non-target *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e *H. influenzae* ATCC 10211. La crescita dei ceppi non-target è totalmente inibita.

12 - LIMITI DEL METODO

- A causa della possibilità di inibizione della crescita di alcuni ceppi di *B. pertussis* da parte della cefalexina, si raccomanda di inoculare una piastra priva di cefalexina o contenente diversi agenti antimicrobici, insieme alla piastra contenente cefalexina.⁴
- La cefalexina inibisce la maggior parte della normale flora nasofaringea fatta eccezione per *P. aeruginosa* e funghi²
- È preferibile ottenere una coltura da campioni rinofaringei raccolti durante le prime 2 settimane di tosse. In questo periodo vi è maggiore probabilità di trovare batteri vitali nel rinofaringe. Dopo le prime 2 settimane, la sensibilità diminuisce ed il rischio di falsi negativi aumenta.
- È stato dimostrato che il tasso di positività con il metodo colturale nei pazienti con pertosse, varia notevolmente (ad es. 20% -83%). Questa ampia variazione è indubbiamente dovuta a diversi fattori: differenze di età dei pazienti, stato di vaccinazione, durata della malattia, somministrazione di antibiotici, carica del patogeno al momento della raccolta dei campioni, adeguatezza dei campioni, terreno di trasporto e terreno di coltura utilizzato, condizioni di incubazione e competenza e familiarità del personale di laboratorio con colture di *B. pertussis*. Nonostante queste considerazioni, la coltura rimane un importante veicolo per stabilire una diagnosi eziologica della pertosse.⁴
- È improbabile che le colture siano positive negli adolescenti e negli adulti con più di 3 settimane di tosse.³
- Una coltura negativa non esclude di per sé la pertosse.³
- La sensibilità diagnostica può essere massimizzata integrando il metodo colturale con la PCR e la sierologia. La PCR è più sensibile della coltura in quanto non richiede che gli organismi siano vitali. La sierologia è particolarmente utile per diagnosticare l'infezione in pazienti che tossiscono da quattro settimane, quando si prevede che sia la coltura che la PCR non siano di aiuto.³
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche, 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 della pertosse. 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 prodotti 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

1. Sutcliffe EM, Abbott JD. Selective medium for the isolation of *Bordetella pertussis* and *parapertussis*. *BMJ* 1971; ii:732-733.
2. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
3. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): Investigation of whooping cough. B6, n° 9, 2018
4. Gary V. Doern. Detection of Selected Fastidious Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 30:166-73
5. Regan, J., and F. Lowe. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J. Clin. Microbiol.* 1977; 6:303-309.
6. Müller FM, Hoppe JE, Wirsing von König CH. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J Clin Microbiol* 1997;35(10):2435-43
7. Katzko G, Hofmeister M, Church D. Extended Incubation of Culture Plates Improves Recovery of *Bordetella* spp. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1563-1564

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	08/2020

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

