

Metodo diagnostico per l'isolamento di microrganismi esigenti da sangue venoso

DESCRIZIONE

Il flacone **HEMO-AEROBIC CULTURING** contiene un terreno liquido particolarmente nutritivo, Brain Heart Infusion Broth (B.H.I.) con Acido p- Aminobenzoico (PABA) e Sodio-polianetol-sulfonato (SPS), per la coltura di microrganismi esigenti, aerobi ed anaerobi facoltativi, provenienti da sangue venoso.

Il flacone è dotato di un tappo in plastica di colore verde, di un sottotappo in gomma perforabile e di un cappuccio protettivo in plastica trasparente, per le confezioni da 80 e 40 mL.

Il flacone **HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal** è dotato di un sottotappo di colore grigio in gomma perforabile e di una ghiera metallica con sovratappo in plastica di colore verde sollevabile.

Per un utilizzo ottimale il prodotto è disponibile in tre presentazioni:

- **HEMO-AEROBIC CULTURING** (per adulti)
- **HEMO-AEROBIC CULTURING Pediatric** (per bambini)
- **HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal** (per neonati e bambini al di sotto dei 2 anni di età)

CONTENUTO DELLE CONFEZIONI

In funzione del suo utilizzo, il contenuto di ciascuna confezione è il seguente:

HEMO-AEROBIC CULTURING

- 6 flaconi da 80 mL di B.H.I. Broth + PABA + SPS
- 1 foglio istruzioni.

HEMO-AEROBIC CULTURING Pediatric

- 6 flaconi da 40 mL di B.H.I. Broth + PABA + SPS
- 1 foglio istruzioni.

HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal

- 6 flaconi da 9 mL di B.H.I. Broth + PABA + SPS
- 1 foglio istruzioni.

PRINCIPIO DEL METODO

I campioni di sangue devono essere prelevati dal paziente con tecnica rigorosamente asettica e strumentazione sterile.

Il campione così ottenuto viene inoculato nel flacone da emocoltura e mescolato con il terreno di coltura in esso contenuto formulato in modo da promuovere la crescita di microrganismi esigenti, aerobi ed anaerobi facoltativi, provenienti da sangue venoso.

Brain Heart Infusion e peptone presenti nel brodo, forniscono aminoacidi e proteine per la crescita dei microrganismi.

Il sodio cloruro contribuisce a mantenere l'equilibrio osmotico del terreno.

Il sodio fosfato bibasico rappresenta il sistema tampone del terreno mentre il destrosio è una fonte di carbonio.

L'acido p- aminobenzoico è un precursore dell'acido folico e neutralizza, attraverso un'inibizione competitiva, gli effetti dei sulfonamidi nell'inoculo.

Il Sodio-polianetol-sulfonato (SPS) inibisce la coagulazione, neutralizza l'effetto battericida del siero umano, impedisce la fagocitosi e inattiva parzialmente taluni antibiotici (streptomina, kanamicina, gentamicina e polimixina B).

FORMULAZIONE DEL TERRENO DI COLTURA (g/L)

Brain Heart Infusion (B.H.I.) Broth with PABA and SPS			
Brain Heart Infusion.....	17.0	Sodio Fosfato Bibasico.....	2.5
Peptone.....	10.0	Acido p- Aminobenzoico.....	0.05
Destrosio	2.0	Sodio-polianetol-sulfonato.....	0.3
Sodio Cloruro.....	5.0	pH finale	7.4 ± 0.2

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni di sangue devono essere prelevati dal paziente per puntura venosa con tecnica rigorosamente asettica e strumenti sterilizzati. La zona della puntura venosa va preparata disinfettando nel modo consueto, per esempio con alcool o altri disinfettanti.

Non toccare la pelle dopo la disinfezione. Eseguire il prelievo venoso badando di non contaminare il sangue con il disinfettante della cute. Aspirare 8-10 mL di sangue venoso (4-5 mL nel caso di un prelievo pediatrico, 0.5- 1 mL nel caso di un prelievo neonatale).

PROCEDURA DEL TEST

a) Tecnica di inoculo

1. Esaminare il flacone di brodo per verificare che non presenti segni di contaminazione.
2. Sollevare il sovratappo di plastica e disinfettare la parte esposta del tappo di gomma sottostante.
3. Perforare il tappo di gomma con l'ago della siringa ed iniettare asetticamente il sangue; la pressione negativa all'interno del flacone favorirà l'aspirazione del volume di sangue prelevato.
4. Richiudere il sovratappo ed agitare accuratamente il flacone per mescolare a fondo il sangue con il terreno di coltura.
5. Scrivere il nome del paziente e altri dati informativi sull'etichetta ed incubare a 36 ± 1 °C.

b) Tecnica di subcoltura

1. Dopo 14- 17 ore di incubazione agitare delicatamente il flacone per risospendere il terreno di coltura ed in condizioni di asepsi effettuare un primo prelievo di circa 1 mL, al fine di favorire il recupero di *Streptococcus pneumoniae* che altrimenti potrebbe andare incontro a fenomeni di autolisi. Seminare su piastra di agar sangue ed incubare a 36 ± 1 °C per 24-48 ore.
2. Prolungare l'incubazione del flacone fino a 24- 48 ore.
3. Agitare delicatamente il flacone per risospendere il terreno di coltura.
4. Aspirare con una siringa sterile un quantitativo del terreno di coltura tale da seminare 1-2 gocce su ciascuna piastra selettiva preparata per la subcoltura. Utilizzare terreni selettivi idonei per l'isolamento di microrganismi Gram-positivi e Gram-negativi, e miceti. Incubare secondo le diverse esigenze dei microrganismi da isolare.
5. Anche nel caso in cui il contenuto del flacone rimanga limpido, effettuare la subcoltura sui terreni selettivi. Effettuare inoltre la colorazione di Gram ed esaminare al microscopio (100X) per osservare la presenza e la morfologia dei microrganismi.
6. Effettuare l'osservazione al microscopio e le subcolture dopo 24, 48 e 72 ore. Nel caso di assenza di crescita di microrganismi sui terreni selettivi, prolungare l'incubazione del flacone a 36 ± 1 °C fino a 7 giorni prima di eseguire una subcoltura finale e considerare il risultato negativo.

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni lotto di **HEMO- AEROBIC CULTURING** viene sottoposto al controllo qualità utilizzando i microrganismi di riferimento seguenti:

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ATCC 7901
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 35152
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6305
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 10211
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615

FATTORI CHE POSSONO INVALIDARE I RISULTATI

La crescita microbica nei flaconi può essere dovuta alla flora cutanea o a contaminazione durante il prelievo o l'inoculo.

In tali casi una seconda emocoltura o la rilevanza clinica del microrganismo isolato indicheranno le infezioni clinicamente significative.

LIMITI ED AVVERTENZE

HEMO-AEROBIC CULTURING si è dimostrato in grado di promuovere la crescita di una grande varietà di microrganismi.

Nell' uso clinico tuttavia taluni microrganismi possono mancare di crescere per i seguenti motivi:

- Trattasi di ceppo particolarmente esigente.
- Il microrganismo non era presente nel campione di sangue.
- Il campione di sangue conteneva una concentrazione inibitoria di qualche chemioantibiotico.
- Non tutti i microrganismi crescono nel periodo di tempo raccomandato per l'incubazione. In alcuni casi l'eliminazione affrettata di una bottiglia di coltura può portare ad un risultato falsamente negativo.

PRECAUZIONI

Il prodotto, **HEMO-AEROBIC CULTURING**, non è classificabile come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze nocive in concentrazioni $\geq 1\%$, pertanto non richiede la disponibilità della Scheda di Sicurezza.

HEMO-AEROBIC CULTURING è un dispositivo monouso da usare solo per uso diagnostico *in vitro*, è destinato ad un ambito professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.

CONSERVAZIONE

Conservare a 10-25 °C nella sua confezione originale. Non conservare vicino a fonti di calore ed evitare eccessive variazioni di temperatura. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento.

ELIMINAZIONE DEL MATERIALE USATO

Dopo l'utilizzazione **HEMO-AEROBIC CULTURING** ed il materiale venuto a contatto con il campione devono essere decontaminati e smaltiti in accordo con le tecniche in uso in laboratorio per la decontaminazione e lo smaltimento di materiale potenzialmente infetto.




BIBLIOGRAFIA

1. Murray P.R. *Manual of Clinical Microbiology* 7th ed. 2005 p. 64- 67. ASM Press, Washington D.C.
2. Finegold S.M. *Diagnostic Microbiology* 7th ed. 1986. p.205- 224. Published C.V. Mosby Co. St. Louis

PRESENTAZIONE

Prodotto	Codice	Confezione
HEMO-AEROBIC CULTURING	490010	6 flaconi
HEMO-AEROBIC CULTURING Pediatric	490030	6 flaconi
HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal	490050	6 flaconi

TABELLA DEI SIMBOLI

LOT	Codice del lotto		Non riutilizzare
REF	Numero di catalogo		Fragile, maneggiare con cura
	Fabbricante		Contenuto sufficiente per <n> saggi
	Utilizzare entro		Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso
	Limiti di temperatura	IVD	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>



HEMO-AEROBIC CULTURING

ENGLISH

Diagnostic device for isolation of fastidious microorganisms from venous blood

DESCRIPTION

The bottle **HEMO-AEROBIC CULTURING** contains a very nutritive medium, Brain Heart Infusion Broth (B.H.I.) with p- Aminobenzoic Acid (PABA) and Sodium-polyanethol-sulphonate (SPS), for culturing fastidious, aerobic and facultative anaerobic, microorganisms from venous blood.

The bottle is endowed with a plastic cap green in colour, a perforable rubber subcap, and a transparent protective cap, for 80 and 40 mL bottles.

The bottle **HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal** is endowed with a perforable rubber stopper grey in color and with a metallic screw cap with a lift plastic overcap green in colour.

For an optimum use the product is available in three presentations:

- **HEMO-AEROBIC CULTURING** (for adults)
- **HEMO-AEROBIC CULTURING Pediatric** (for children)
- **HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal** (for new-borns and children under 2 years old)

CONTENT OF THE PACKAGES

On the basis of its use, the content of each package is the following:

HEMO-AEROBIC CULTURING

- 6 bottles with 80 mL of B.H.I. Broth + PABA + SPS
- 1 instructions sheet.

HEMO-AEROBIC CULTURING Pediatric

- 6 bottles with 40 mL of B.H.I. Broth + PABA + SPS
- 1 instructions sheet.

HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal

- 6 bottles with 9 mL of B.H.I. Broth + PABA + SPS
- 1 instructions sheet.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Blood samples must be drawn from the patient with rigorously aseptic technique and sterile devices. The so-obtained sample is inoculated into the hemo-culturing bottle and mixed with the liquid medium whose formulation increases the growth of fastidious, aerobic and facultative anaerobic, microorganisms from venous blood.

Brain Heart Infusion and peptone in the broth provide amino acids and proteins for microorganisms growth. Sodium chloride maintains the osmotic balance of the medium.

Sodium phosphate bibasic is the buffer of the medium and dextrose is a carbon source. p- Aminobenzoic Acid is a forerunner of folic acid and neutralizes the effects of sulphonamides in the inoculum through a competitive inhibition.

Sodium-polyanethol-sulphonate inhibits coagulation, neutralizes bactericide effect of human serum, prevents fagocytosis and partially inactivates some antibiotics (streptomycin, kanamycin, gentamicin and polymyxin B).

CULTURE MEDIUM FORMULA (g/L)

Brain Heart Infusion (B.H.I.) Broth with PABA and SPS			
Brain Heart Infusion.....	17.0	Sodium Phosphate Bibasic.....	2.5
Peptone.....	10.0	p- Aminobenzoic Acid.....	0.05
Dextrose.	2.0	Sodium-polyanethol-sulphonate..	0.3
Sodium Chloride.....	5.0	Final pH	7.4 ± 0.2

COLLECTION AND STORAGE OF THE SAMPLE

Blood samples must be collected from the patient by puncturing the vein with strictly aseptic technique and sterile devices.

The zone of the venous puncture must be prepared disinfecting in the usual way, for example with alcohol or other disinfectants.

Do not touch the skin after the disinfection. Perform blood collection caring not to contaminate blood with the disinfectant.

Collect 8-10 mL of venous blood (4-5 mL in case of pediatric collection, 0.5- 1 mL in case of neonatal collection).

TEST PROCEDURE

a) Inoculum technique

1. Observe the broth in the bottle and check there are not signs of contamination.
2. Lift the protective plastic cap and disinfect the external side of the rubber stopper.
3. Penetrate the rubber stopper with the syringe needle and aseptically inject the blood: negative pressure in the bottle will allow the intake of the drawn blood.
4. Close the protective plastic cap and carefully mix blood with culture medium in the bottle.
5. Write patient's name and other informative data on the label and incubate at 36 ± 1 °C.

b) Subculturing technique

1. After 14- 17 hours incubation gently mix the bottle in order to suspend culture medium and aseptically perform a first collection of about 1 mL, so to favour *Streptococcus pneumoniae* recovery which otherwise could go towards autolysis. Inoculate on a blood agar plate and incubate at 36 ± 1 °C for 24-48 hours.
2. Prolong the incubation of the bottle up to 24- 48 hours.
3. Gently mix the bottle so to suspend the culture medium.
4. Draw with a sterile syringe an amount of culture medium so to inoculate 1-2 drops on each selective plate prepared for subculture. Use suitable media for the isolation of Gram-positive and Gram-negative microorganisms, and mycetes. Incubate according to the different needs of the microorganisms to isolate.
5. Even if the culture medium is clear perform the subculture on selective media. Beside perform Gram staining and examine at the microscope (100X) to observe the presence and the morphology of microorganisms.
6. Perform observation at microscope and subcultures after 24, 48 and 72 hours. If there is no growth of microorganisms on selective media, prolong the incubation time of the bottle at 36 ± 1 °C until 7 days, before performing final subculture and considering negative the result.

QUALITY CONTROL

Each batch of **HEMO- AEROBIC CULTURING** is subjected to the quality control using the following reference microorganisms:

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ATCC 7901
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 35152
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6305
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 10211
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615

FACTORS THAT MAY INVALIDATE THE RESULTS

Bacterial growth in the bottles can be due to the skin flora or to contamination during the collection or inoculum. In these cases a second blood culture or clinical importance of the isolated microorganism will indicate clinically significant infections.

LIMITS AND WARNINGS

HEMO-AEROBIC CULTURING can promote the growth of a wide variety of microorganisms.

Nevertheless in clinical use some microorganisms can fail to grow for the following reasons:

- the strain is particularly fastidious.
- the microorganism was not present in the blood sample.
- the blood sample contained an inhibiting concentration of a chemoantibiotic.
- some microorganisms do not grow in the recommended incubation time. In some cases early elimination of a culture bottle can lead to a falsely negative result.

CAUTIONS

The product **HEMO-AEROBIC CULTURING** cannot be classified as hazardous under current legislation, nor does it contain harmful substances in concentrations $\geq 1\%$; it therefore does not require a Safety Data Sheet to be available.

HEMO-AEROBIC CULTURING is a disposable device to be used only for diagnostic use *in vitro*. It must be used in the laboratory by properly trained personnel, using approved aseptic and safety methods for handling pathogenic agents.

STORAGE

Store at 10-25 °C in the original packaging. Keep away from sources of heat and avoid excessive changes in temperature.

In such conditions, the product will remain valid until the expiry date indicated on the label. Do not use beyond that date.

Eliminate without using if there are signs of deterioration.

DISPOSAL OF USED MATERIAL

After use, **HEMO-AEROBIC CULTURING** and material that has come into contact with the sample must be decontaminated and disposed of in accordance with the techniques used in the laboratory for decontamination and disposal of potentially infected material.








REFERENCES

1. Murray P.R. Manual of Clinical Microbiology 7th ed. 2005 p. 64- 67. ASM Press, Washington D.C.
2. Finegold S.M. Diagnostic Microbiology 7th ed. 1986. p.205- 224. Published C.V. Mosby Co. St. Louis

PRESENTATION

Product	Code	Package
HEMO-AEROBIC CULTURING	490010	6 bottles
HEMO-AEROBIC CULTURING Pediatric	490030	6 bottles
HEMO-AEROBIC CULTURING Neonatal	490050	6 bottles

TABLE OF SYMBOLS

LOT	Batch Code		Do not reuse
REF	Catalogue Number		Fragile, handle with care
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use by		Caution, consult accompanying documents
	Temperature limitation	IVD	<i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i>