

G.C. MEDIUM BASE

Base per la preparazione di terreni "agar-cioccolato"
arricchiti o selettivi, per l'isolamento e la coltivazione
di *Haemophilus* e *Neisseria* ed altri microrganismi esigenti

FORMULA TIPICA (g/l)

Peptocomplex	15
Amido	1
Potassio fosfato bibasico	4
Potassio fosfato monobasico	1
Sodio cloruro	5
Agar	12

PREPARAZIONE

Sospendere 38 g di polvere in 1000 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Aggiungere gli arricchimenti e gli agenti selettivi desiderati.

pH finale 7.2 ± 0.2

DESCRIZIONE ED IMPIEGO

G.C. Medium Base è un terreno che, addizionato di arricchimenti e di agenti selettivi, si presta all'isolamento e alla coltivazione dei gonococchi e dei meningococchi, di *Haemophilus* ed in generale alla coltivazione dei microrganismi patogeni esigenti.

Neisseria gonorrhoeae e *Neisseria meningitidis* sono diplococchi Gram negativi, immobili, aerobi, catalasi e ossidasi positivi; producono acidi dal glucosio per via ossidativa. Hanno esigenze colturali complesse e coltivano in presenza di CO₂ a concentrazioni tra il 2 e il 10%.

All'interno del genere *Neisseria*, *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, sono le uniche specie considerate patogene per l'uomo: *N. meningitidis* è l'agente eziologico della meningite cerebrospinale epidemica, *N. gonorrhoeae* è l'agente eziologico della blenorragia.

Alcune altre specie del genere *Neisseria* si trovano in infezioni umane anche gravi e vengono considerate patogeni opportunisti; queste ultime e le specie non patogene che si ritrovano comunemente nella flora normale nasofaringea e vaginale sono distinguibili dalle specie patogene per le loro minori esigenze nutrizionali, per la pigmentazione delle colonie (in alcune specie) e per le loro attività biochimiche.

N. gonorrhoeae e *N. meningitidis* si trovano comunque anche in soggetti asintomatici e costituiscono una riserva d'infezione di notevole importanza. Le tecniche colturali sono considerate il metodo diagnostico più sensibile per la ricerca del gonococco; una diagnosi presuntiva può essere supportata dalla crescita su terreno selettivo appropriato, dal test dell'ossidasi e dall'osservazione microscopica della presenza di diplococchi Gram negativi. Per il prelievo e la conservazione dei campioni per la ricerca del gonococco, sono raccomandati o i terreni di trasporto tamponati (Amies Bioswab cat. n. 213170M) per conservazioni non oltre le 12 ore. I campioni sui quali ricercare il meningococco non devono essere conservati ma inviati immediatamente al laboratorio.

Per l'isolamento di *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* i terreni raccomandati sono il Modified Thayer Martin Medium o il New York City Medium e l'agar cioccolato arricchito.

MODIFIED THAYER MARTIN (MTM) MEDIUM

Il terreno è raccomandato dall'ASM e dal CDC per l'isolamento delle neisserie da campioni clinici ed è preparato in accordo alla formula di Thayer e Martin modificata da Martin e Lester sulla scorta delle osservazioni sull'impiego del trimetoprim lattato nel sopprimere la crescita e la sciamatura dei protei. Martin e coll. in uno studio comparativo tra terreno di Thayer Martin e terreno di Thayer Martin modificato hanno trovato che con quest'ultimo vi è un aumento del 10% nell'isolamento del gonococco nei pazienti femminili. MTM Medium è stato inoltre trovato particolarmente indicato nell'esame dei "tamponi rettali", nei quali più alta è la contaminazione da protei.

Il Modified Thayer Martin (MTM) Medium è preparato addizionando al GC Medium Base, emoglobina 1% o sangue defibrinato di montone 5% cotto per formare "agar cioccolato", glucosio 0.15%, il

supplemento selettivo VCNT (vancomicina 3 µg/ml, colistina metansulfonato 7.5 µg/ml, nistatina 12.5 U/ml, trimetoprim 5 µg/ml), l'arricchimento chimicamente definito Biovitex, contenente vitamine, cofattori, aminoacidi e carboidrati. La vancomicina inibisce i contaminanti Gram positivi, la colistina i batteri Gram negativi, la nistatina i funghi, il trimetoprim la crescita e la sciamatura dei protei. Il Biovitex fornisce tutti i fattori necessari alla crescita delle neisserie.

Per una descrizione completa si rimanda alla scheda tecnica delle piastre pronte di Modified Thayer Martin Medium.

NEW YORK CITY MEDIUM

Il terreno è preparato secondo la formulazione messa a punto da Faur del New York City Department of Health e successive modifiche.

L'emoglobina o il sangue cotto e l'arricchimento chimicamente definito dei terreni classici, sono sostituiti nel NYC Medium dal sangue lisato, dal plasma di cavallo e dal dializzato di cellule di lievito.

La composizione del supplemento selettivo tiene conto di quanto emerso complessivamente dalla ricerca sugli antibiotici più idonei ad inibire la crescita dei saprofiti e a consentire lo sviluppo delle neisserie. Tale supplemento selettivo è denominato VCAT ed è costituito da vancomicina 2 µg/ml per inibire la crescita dei Gram positivi, colistina 7.5 µg/ml per inibire la crescita dei Gram negativi, anfotericina B 1.0 µg/ml, trovata superiore alla nistatina nell'inibizione dei funghi, trimetoprim 3 µg/ml per inibire lo sviluppo e la sciamatura dei protei. La concentrazione della vancomicina nel NYC Medium è ridotta da 3 a 2 µg/ml, rispetto alla formula originale, per consentire una maggiore crescita di *N. gonorrhoeae*.

In uno studio condotto su 1000 campioni di origine clinica, Granato e coll. hanno trovato un aumento del 13.3% nell'isolamento dei gonococchi, utilizzando il NYC Medium in parallelo con il terreno di Thayer Martin modificato, crescite più rigogliose, un maggior numero di colonie ed una capacità selettiva comparabile a quella del MTM Medium. Sul NYC Medium coltivano molto bene anche *N. meningitidis*, i micoplasmi a larghe colonie ed *Ureaplasma urealyticum*. Quest'ultima caratteristica del terreno consente di diagnosticare insieme ai gonococchi, anche le infezioni sintomatiche o asintomatiche da micoplasmi. Per una descrizione completa si rimanda alla scheda tecnica delle piastre pronte di New York City Medium.

AGAR CIOCCOLATO AGAR CIOCCOLATO ARRICCHITO

I due terreni si possono preparare aggiungendo al GC Medium Base il 7% di sangue defibrinato sterile di cavallo e riscaldando a 80°C per 15 minuti. Per l'agar cioccolato arricchito si deve aggiungere inoltre il Biovitex (cat n. 4240009), contenente il NAD ed altri cofattori, vitamine, aminoacidi, glucosio, ecc. L'agar cioccolato arricchito è particolarmente indicato per l'isolamento di *Haemophilus* spp. e di *N. gonorrhoeae* quando sui terreni selettivi non si siano ottenute crescite microbiche in presenza di una chiara sintomatologia blenorragica.

Agar Cioccolato consente una buona crescita delle neisserie ma non una crescita ottimale degli emofili poichè durante il riscaldamento viene parzialmente denaturato il fattore V (NAD) che è termolabile.

I due terreni contengono amido insolubile che neutralizza i metaboliti tossici che si sviluppano durante la crescita microbica e che interferiscono con lo sviluppo delle neisserie.

Per l'isolamento di *H. influenzae* da campioni contaminati dalla flora delle alte vie respiratorie è possibile impiegare l'agar cioccolato arricchito e reso selettivo dall'aggiunta della miscela di antibiotici descritta da Chapin e Doern: vancomicina 10 µg/ml, bacitracina 300 µg/ml e clindamicina 1 µg/ml (Haemophilus Antimicrobial Supplement Cat. n. 4240010).

Per una descrizione completa si rimanda alle schede tecniche delle piastre pronte "Chocolate Agar Enriched" e "Chocolate Agar Bacitracine"

CONTROLLO QUALITÀ (AGAR CIOCCOLATO 37°C-24 H, CO₂)

Controllo produttività

N.gonorrhoeae ATCC 43069 or 43070: crescita

H.influenzae ATCC 10211: crescita

CONTROLLO QUALITÀ (NEISSERIA SELECTIVE MEDIA, 37°C-24/48 H, CO₂)

Controllo produttività

N.gonorrhoeae ATCC 43069 or 43070 : crescita

Controllo selettività

S.epidermidis ATCC 12228 : parzialmente inibito

P.mirabilis ATCC 43071: parzialmente inibito (ceppo da usare per i terreni contenenti trimetoprim)

CONTROLLO QUALITÀ (HAEMOPHILUS SELECTIVE MEDIUM 37°C-24 H, CO₂)

Controllo produttività

H.influenzae ATCC 10211: crescita

Controllo selettività

E.faecalis ATCC 19433 : inibito

CONSERVAZIONE

Conservare a 10-30°C al riparo della luce, in luogo asciutto. 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 evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento della polvere ecc.)

Conservare le piastre di agar cioccolato preparato in laboratorio per un massimo di 1 mese a 2-8°C.

Conservare le piastre selettive per *Neisseria* ed *Haemophilus* preparate in laboratorio per un massimo di 7 giorni a 2-8°C

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

Il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni $\geq 1\%$. Come per tutti i terreni in polvere anche la manipolazione del GC Medium Base deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie.

Solo per uso diagnostico *in vitro*. Il prodotto qui descritto deve essere usato solo in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati e con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le piastre dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

BIBLIOGRAFIA

- U.S. Pub. Hlth. Service, CDC, Veneral Dis. Br.: Criteria and Techniques for the Diagnosis of Gonorrhoea, 1971.
- Morello J.A. and M. Bohnhoff. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, 3rd Ed. 1980, pg. 111-130.
- Kellogg D.S., Holmes, K.K., Hill G.A. (1976) Laboratory Diagnosis of Gonorrhoea. Cumitech 4, American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Memor, Recom. to use the same medium, MTM in both plates and bottles for the GC Cul. Scr. Prog., CDC, Atlanta, GA, 1975.
- Thayer J.D. and Martin J.E. (1966) Improved Medium for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Public Health Reports. 81, 559-562.
- Martin, J.E. and Lester, A. (1971) Transgrow, a medium for transport and growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. HSMHA Health Reports. 86, 30-33.
- Seth, A. (1970) Use of trimethoprim to prevent overgrowth by *Proteus* in the cultivation of *N. gonorrhoeae*. Brit. J. Vener. Dis. 46, 201-202.
- Martin, J.E., Armstrong J.H., Smith P.B. (1974) New system for cultivation of *N. gonorrhoeae* App. Microbiol. 27, 802-805.
- Faur, Y.C. Weisburd, M.H., Wilson, M.E. (1973) A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC Medium) I. Formulation and comparison with standard media. Health Lab. Sci, 10, 44-54.
- Faur, Y.C. Weisburd, M.H., Wilson, M.E. (1973) A new medium for the isolation of pathogenic *Neisseria* (NYC Medium) II. Effect of amphotericin B and trimethoprim lactate on selectivity. Health Lab. Sci. 10, 55-60.
- Faur, Y.C., Weisburd, M.H., Wilson, M.E. (1978) The selectivity of vancomycin and lincomycin in NYC Medium for the recovery of *N. gonorrhoeae* in clinical specimens. Health Lab. Sci. 15, 22-27.
- Whitbeck, E., Shemonsky N., Levison, M. (1975) Superiority of amphotericin over nistatin in Thayer Martin Medium. Ant. Ag. Chemoter. 7, 658-660.
- Granato, P.A. Schneible-Smith, C., Weiner, L.B. (1981) Use of New York City Medium for improved recovery of *N. gonorrhoeae* from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 13, 963-968.
- Faur, Y.C., Weisburd, M.H., Wilson, M.E. (1974) NYC Medium for simultaneous isolation of *N. gonorrhoeae*, large-colony Mycoplasmas, and T-Mycoplasmas. App. Microbiol. 27, 1041-1045.
- NCCLS document M22-A2, 1996. Quality Assurance for Commercially prepared Microbiological Culture Media-Second Ed.; Approved Standard
- Perine, P.L., Westbrook, W.G., Biddle J.W. Lewis J.S., Martin J.E. (1982) Culture Medium for confirmation of penicillin-resistant and penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae*. J. Clin. Microbiol. 15, 865-868.
- Chapin C.K. and G.V. Doern (1983) Selective media for recovery of *H. influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. J. Clin. Microbiol. 17, 1163-1165.

CONFEZIONI

4015202 GC Medium Base, 500 g (13.1 l)

4015204 GC Medium Base, 5 kg (131 l)

CODICE CND W0104010101

