

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

BBL Seven H11 Agar è un terreno di coltura per l'isolamento e la coltivazione di micobatteri.

II PROCEDURA DEL TEST

A. Procedura di preparazione degli inoculi

1. Inoculare gli slant di terreno Lowenstein-Jensen con colture di stock dei ceppi micobatterici pertinenti usando bastoncini di inoculo sterili.
2. Incubare le provette – con i tappi non completamente avvitati – a 35 ± 2 °C in aerobiosi supplementata con anidride carbonica, sino a ottenere una crescita intensa (generalmente 2 – 3 settimane).
3. Raccogliere la crescita con un bastoncino appuntito, rimuovendo delicatamente le cellule dalla superficie del terreno, prestando attenzione a non includere terreno di coltura nel raccolto cellulare.
 - a. Per *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Trasferire la crescita in 5,0 mL di brodo Middlebrook 7H9 con glicerolo in una provetta sterile di vetro, con tappo a vite, contenente microsfere di vetro sterili.
 - (2) Vortexare accuratamente (per alcuni minuti) finché la sospensione non è priva di grumi macroscopici.
 - (3) Comparare questa sospensione a uno standard McFarland n. 1 nefelometrico. La sospensione deve essere più torbida dello standard.
 - (4) Porre la provetta in un portaprovette per 2 – 3 h, a temperatura ambiente per consentire alle particelle macroscopiche di depositarsi sul fondo.
 - (5) Trasferire il sovrnatante in un contenitore sterile.
 - (6) Correggere la torbidità della sospensione allo standard McFarland n. 1 dispensando lentamente brodo Middlebrook 7H9 sterile con glicerolo. Agitare accuratamente.
 - (7) Prima dell'uso, diluire a 10^5 UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare con uno striscio il terreno per il test usando un'ansa calibrata da 0,01 mL.
 - b. Per tutti gli altri ceppi micobatterici:
 - (1) Trasferire la crescita in una provetta sterile per centrifuga, con tappo a vite, da 50 mL, contenente 8–12 microsfere di vetro sterili (del diametro di 2 mm) e 5 mL di diluente *Mycobacterium* preparato nel modo seguente.
 - Mescolare i seguenti ingredienti in un matraccio da 1L e correggere il pH a 6,7 – 7,0, usando soluzione 1N di idrossido di sodio.

Albumina bovina (priva di acidi grassi).....	1,0	g
Polisorbato 80	0,1	mL
Acqua purificata	500	mL
 - Sterilizzare mediante filtrazione a membrana (filtro da 0,2 μ)
 - Dispensare in asepsi, in aliquote di 5,5 mL, in provette sterili con tappo a vite.
 - (2) Emulsionare la crescita micobatterica sulla parete laterale della provetta per centrifuga con tappo a vite, usando un bastoncino. Mescolare la crescita con il diluente.
 - (3) Tappare la provetta e vortexare per circa 10 min, finché la crescita non è perfettamente sospesa e priva di grumi macroscopici.
 - (4) Dispensare 15 mL di diluente *Mycobacterium* e mescolare accuratamente.
 - (5) Comparare questa sospensione a uno standard McFarland n. 1 nefelometrico. La sospensione deve essere più torbida dello standard.
 - (6) Porre la provetta in un portaprovette per 2 – 3 h, a temperatura ambiente per consentire alle particelle macroscopiche di depositarsi sul fondo.
 - (7) Aspirare il sovrnatante e trasferirlo in un contenitore sterile. La sospensione deve essere più torbida dello standard McFarland n. 1 e priva di particelle macroscopiche. Se sono ancora presenti particelle macroscopiche, mescolare e lasciare riposare ancora per 1 h. Trasferire il sovrnatante in un contenitore sterile.
 - (8) Correggere la torbidità della sospensione allo standard McFarland n. 1 dispensando lentamente diluente *Mycobacterium* sterile. Agitare accuratamente.
 - (9) Dispensare aliquote della sospensione in flaconi per congelatore, recanti un'etichetta contenente l'identificazione dei microrganismi e la data di preparazione.
 - (10) Congelare le sospensioni ponendo i flaconi in un congelatore a bassa temperatura, a -60 °C. I flaconi possono essere conservati per un massimo di 6 mesi.
 - (11) Per l'uso, rimuovere il flacone congelato dal congelatore e scongelare rapidamente il contenuto ponendo la provetta a bagnomaria a 30 – 35 °C. Prima dell'uso, diluire a 10^5 UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare con uno striscio il terreno per il test usando un'ansa calibrata da 0,01 mL.

B. Procedura per il test del terreno

- Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
 - Con l'ausilio di un'ansa calibrata sterile monouso da 0,01 mL, inoculare i contenitori per il test usando colture preparate come sopra.
 - Incubare i contenitori – con i tappi non completamente avvitati – a 35 ± 2 °C in aerobiosi supplementata con anidride carbonica.
 - Includere come controlli i contenitori di agar Middlebrook 7H10 precedentemente testato.
- Esaminare le provette dopo 7, 14 e – se necessario – 21 giorni per verificare crescita e selettività.
- Risultati attesi

Micorganismo	ATCC	Recupero
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Crescita
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , gruppo I	12478	Crescita
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , gruppo II	19981	Crescita
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , gruppo III	13950	Crescita
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , gruppo IV	6841	Crescita

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

N.B.: Monitoraggio a carico degli utenti, in conformità a CLSI M22-A3.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

- Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
- Eeguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
- Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Il terreno **BBL** Seven H11 Agar è usato in procedure qualitative per l'isolamento e la coltivazione di micobatteri.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Sono stati concepiti numerosi terreni di coltura per la coltivazione di micobatteri. I primi erano formulazioni a base d'uovo, comprendenti terreno Lowenstein-Jensen e terreno Petragnani. Dubos e Middlebrook hanno svolto un ruolo fondamentale nello sviluppo di numerose formulazioni contenenti acido oleico e albumina come ingredienti chiave per facilitare la crescita dei bacilli tubercolari e proteggere i microrganismi da svariati agenti tossici.¹ Successivamente, Middlebrook e Cohn hanno migliorato la formulazione dell'agar acido oleico-albumina, ottenendo una crescita più rapida e ricca di *Mycobacterium* spp. sul loro terreno, definito 7H10.^{2,3}

Cohn et al. hanno modificato la formulazione dell'agar 7H10 aggiungendo un grammo di digerito pancreatico di caseina per litro allo scopo di migliorare la crescita dei ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* caratterizzati da crescita scarsa (o del tutto assente) sull'agar 7H10 e su altri terreni di isolamento tradizionali.⁴ Questa formulazione è stata definita Seven H11 Agar.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il terreno BBL Seven H11 Agar contiene svariati sali inorganici che forniscono le sostanze essenziali per la crescita dei micobatteri. Il citrato di sodio, allorché convertito in acido citrico, serve a mantenere alcuni cationi inorganici in soluzione. Il glicerolo è una fonte ricca di carbonio ed energia. Il digerito pancreatico di caseina è una fonte ricca di azoto per la crescita dei bacilli tubercolari e fornisce svariati fattori di crescita aggiuntivi.¹ L'acido oleico e altri acidi grassi a catena lunga possono essere utilizzati dai bacilli tubercolari e svolgono un importante ruolo nel metabolismo dei micobatteri. L'effetto principale dell'albumina è quello di proteggere da agenti tossici i bacilli tubercolari, migliorando così il recupero di questi ultimi sull'isolamento primario. La parziale inibizione dei batteri si ottiene grazie alla presenza del colorante verde malachite.

VII REAGENTI

BBL Seven H11 Agar

Formula approssimata* per 900 mL di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	1,0	g
Solfato di magnesio	0,05	g
Citrato ferrico di ammonio	0,04	g
Citrato di sodio	0,4	g
Ammonio Solfato	0,5	g
Glutammato monosodico	0,5	g
Fosfato disodico	1,5	g
Fosfato monopotassico	1,5	g
Agar	13,5	g
Piridossina	1,0	mg
Solfato di zinco	1,0	mg
Solfato di rame	1,0	mg
Biotina	0,5	mg
Cloruro di calcio	0,5	mg
Verde malachite	0,25	mg

Il terreno completo in provette pronte per l'uso, oltre agli ingredienti sopra elencati, contiene – per litro – 5 mL di glicerolo e i componenti dell'arricchimento Middlebrook OADC, vale a dire:

Cloruro di sodio	0,85	g
Destrosio	2,0	g
Albumina bovina (frazione V)	5,0	g
Catalasi	3,0	mg
Acido oleico	0,06	mL

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Avvertenze e precauzioni: Per uso diagnostico *in vitro*.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".⁵⁻⁸ Dopo l'uso, le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Per le manipolazioni di campioni clinici (es. preparazione di strisci acido-resistenti) che non comportano produzione di aerosol, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 2. Tutte le procedure che comportano la generazione di aerosol devono essere eseguite sotto cappa di sicurezza biologica di Classe I o II. Per le attività di laboratorio che comportano la propagazione e manipolazione di colture di *M. tuberculosis* ed *M. bovis*, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 3. Anche gli studi su animali richiedono procedure speciali.⁷

Istruzioni per la conservazione: Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per la durata raccomandata (fino a 8 settimane per i terreni di micobatterologia). Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto: Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.⁹⁻¹² Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito: BBL Seven H11 Agar

Materiali necessari ma non forniti: Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test: Adottare tecniche asettiche.

Le procedure di test sono quelle raccomandate dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) per l'isolamento primario da campioni contenenti micobatteri.⁹ Si raccomanda una soluzione di N-acetil-L-cisteina e idrossido di sodio (NALC-NaOH) come agente – delicato ma efficace – sia per la decontaminazione che per la digestione. Questi reagenti sono contenuti nel kit di digestione/decontaminazione dei campioni micobatterici **BBL MycoPrep**. Per informazioni dettagliate sui metodi di decontaminazione e coltura, consultare la documentazione appropriata.⁹⁻¹²

Dopo l'inoculo, conservare le provette al riparo dalla luce e porle in un sistema appropriato per aerobiosi supplementata con anidride carbonica e incubare a 35 ± 2 °C.

Incubare i terreni slant su un piano orizzontale, finché l'inoculo non è assorbito. Per le prime 3 settimane, non avvitare completamente i tappi delle provette allo scopo di consentire la circolazione dell'anidride carbonica per l'inizio della crescita.

Successivamente, avvitare completamente i tappi per evitare la disidratazione; svitarli brevemente una volta alla settimana. Disporre le provette verticalmente in caso di problemi di spazio.

NOTA - Incubare a 25 – 33 °C le colture da lesioni cutanee sospettate di contenere *M. marinum* o *M. ulcerans* per l'isolamento primario; le colture che si sospetta contengano *M. avium* o *M. xenopi* evidenziano una crescita ottimale a 40 – 42 °C.⁹ Incubare una coltura duplicata a 35 – 37 °C.

Controllo di qualità a cura dell'utente: Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

X RISULTATI

Esaminare le colture entro 5 – 7 giorni dall'incubazione e successivamente una volta alla settimana per un massimo di 8 settimane.

Annotare quanto osservato.⁹

1. Numero di giorni impiegato dalle colonie per essere macroscopicamente visibili. I microrganismi a crescita rapida presentano colonie mature entro 7 giorni, mentre quelli a crescita lenta necessitano di più di 7 giorni per formare colonie mature.
2. Produzione di pigmento
Bianco, crema o color cuoio = Non cromogeno (NC)
Limone, giallo, arancio, rosso = Cromogeno (Ch)
Gli strisci colorati possono presentare bacilli acido-resistenti, refertati soltanto come "bacilli acido-resistenti", a meno che non si eseguano test definitivi.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.¹⁰⁻¹²

XII PERFORMANCE

Cohn et al. hanno condotto uno studio comparando Seven H11 Agar a 7H10 Agar. Dei 96 isolati clinici di *M. tuberculosis* testati, 13 non hanno evidenziato alcuna crescita sul terreno 7H10 nelle prime tre settimane. Dieci delle 13 colture su Seven H11 Agar hanno evidenziato crescita in tre settimane, mentre le rimanenti tre hanno avuto bisogno di altre tre settimane di incubazione per evidenziare crescita visibile.⁴

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
221391	BD BBL Seven H11 Agar Slants, confezione da 10 provette di misura A
221392	BD BBL Seven H11 Agar Slants, cartone da 100 provette di misura A
296105	BD BBL Seven H11 Agar Slants, confezione da 10 provette di misura C
297704	BD BBL Seven H11 Agar Slants, cartone da 100 provette di misura C

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Dubos, R.J., and G. Middlebrook. 1947. Media for tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* 56:334-345.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am. J. Public Health.* 48:844-853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, W.E. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* 38:66-81.
4. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 98:295-296.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
7. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
8. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.*
9. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
12. Metchock, B.G., F.S. Nolte, and R.J. Wallace, Jr. 1999. *Mycobacterium*, p. 399-437. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenoer, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD