

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

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

II PROCEDURA DEL TEST

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sottoelencate.
 - a. Prima dell'inoculo, verificare che le piastre siano prive di umidità.
 - b. Strisciare le piastre per l'isolamento, usando una coltura diluita in modo da ottenere 10^3 – 10^4 UFC.
 - c. Incubare le piastre a 35 ± 2 °C in aerobiosi supplementata con anidride carbonica.
2. Esaminare le piastre dopo 7–21 giorni per verificare la crescita e la pigmentazione.
3. Risultati attesi

Microrganismi	ATCC	Recupero
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Crescita da moderata a intensa
* <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 dell'utilizzatore, in conformità a CLSI M22-A3.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le piastre come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo di piastre rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $6,6 \pm 0,2$.
4. Verificare la stabilità delle piastre durante la procedura di inoculo.
5. Incubare a 35 ± 2 °C per 72 h le piastre rappresentative non inoculate ed esaminarle per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Il terreno **BD BBL Seven H11 Agar** è usato in procedure qualitative per l'isolamento e la coltura di micobatteri. Le piastre sono riempite in profondità per ridurre gli effetti di essiccamento durante un'incubazione prolungata.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Sono stati concepiti numerosi terreni per la coltura 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* che avevano evidenziato crescita scarsa (o del tutto assente) sull'agar 7H10 e su altri terreni di isolamento tradizionali.⁴ Questa formulazione è stata definita **BD BBL Seven H11 Agar**. In uno studio di Cohn et al., dei 96 isolati clinici, 13 non hanno evidenziato alcuna crescita sul terreno 7H10 nelle prime tre settimane, dieci delle 13 colture su **BD BBL 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

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il terreno **BD 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. La catalasi distrugge i perossidi tossici eventualmente presenti nel terreno. 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. L'inibizione parziale dei batteri viene ottenuta grazie alla presenza del colorante verde malachite.

VII REAGENTI

BD BBL Seven H11 Agar

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	1,0 g	Albumina bovina V	5,0 g
Solfato di magnesio	0,05 g	Catalasi	3,0 mg
Citrato ferrico di ammonio	0,04 g	Piridossina	1,0 mg
Citrato di sodio	0,4 g	Solfato di zinco	1,0 mg
Ammonio Solfato	0,5 g	Solfato di rame	1,0 mg
Glutammato monosodico	0,5 g	Biotina	0,5 mg
Fosfato disodico	1,5 g	Cloruro di calcio	0,5 mg
Fosfato monopotassico	1,5 g	Verde malachite	0,25 mg
Agar	13,5 g	Acido oleico	0,06 mL
Cloruro di sodio	0,85 g	Glicerolo	5,0 mL
Destrosio	2,0 g		

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

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Se si riscontra un'umidità eccessiva, capovolgere il fondo su un coperchio e lasciare asciugare all'aria per evitare la formazione di aderenze tra la parte superiore e inferiore della piastra durante l'incubazione.

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 piastre preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Per la manipolazione 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* e *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 piastre al buio a 2–8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. Le piastre preparate, conservate nell'involucro originario a 2–8 °C sino al momento dell'uso, possono essere inoculate fino alla data di scadenza e incubate per i tempi di incubazione raccomandati (fino a 8 settimane in caso di terreni micobatterologici). Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, sono stati concepiti svariati tamponi e contenitori. Raccogliere i campioni prima della somministrazione di terapia antibiotica. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio. Per prolungare la sopravvivenza dei microrganismi allorché si prevede un intervallo di tempo significativo tra raccolta e coltura definitiva, sono stati concepiti numerosi terreni di conservazione o sistemi di trasporto, come per esempio i prodotti per la raccolta e il trasporto dei campioni **BD BBL**.

Per informazioni dettagliate sulle procedure di raccolta e preparazione dei campioni, consultare la documentazione appropriata.^{9,10}

IX PROCEDURA

Materiale fornito

BD BBL Seven H11 Agar (Deep Fill)

Materiali necessari ma non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test

La superficie agar deve essere omogenea e non eccessivamente umida.

Le procedure dei test sono quelle consigliate dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) per l'isolamento primario da campioni contenenti micobatteri.¹¹ 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 **BD MycoPrep**. Per informazioni dettagliate sui metodi di decontaminazione e coltura, consultare la documentazione appropriata.⁹⁻¹²

Dopo l'inoculazione, conservare le piastre al riparo dalla luce e disporle con il lato del terreno verso il basso, in un sistema **BD GasPak EZ** o altro sistema appropriato per atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica; incubare a 35 ± 2 °C.

N.B. Le colture provenienti da lesioni cutanee dovute presumibilmente a *M. marinum* o *M. ulcerans* dovranno essere incubate a 25–33 °C per l'isolamento primario; le colture con presenza sospetta di *M. avium* o *M. xenopi* presenteranno una crescita ottimale a 40–42 °C.¹¹ Incubare una seconda coltura a 35–37 °C.

Controllo di qualità a cura dell'utente

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

I risultati delle piastre di coltura dovranno essere letti entro 5–7 giorni dall'inoculo e successivamente una volta alla settimana per un massimo di 8 settimane.

Per la lettura, capovolgere le piastre sulla stazione di un microscopio da dissezione. Leggere a 10–60x con luce trasmessa. Effettuare la scansione rapida a 10–20x per ricercare la presenza di colonie. Per osservare la morfologia delle colonie – es. colonie a serpentina – può risultare utile un ingrandimento più elevato (30–60x).

Registrare le osservazioni seguenti.¹¹

1. Numero di giorni necessari perché le colonie diventino macroscopicamente visibili.
2. Numero di colonie:
Nessuna colonia = Negativo
Meno di 50 colonie = Conta effettiva
50–100 colonie = 1+
100–200 colonie = 2+
Quasi confluyente (200–500) = 3+
Confluyente (più di 500) = 4+
3. Produzione di pigmento
Bianco, crema o color cuoio = Non cromogeno (NC)
Limone, giallo, arancio, rosso = Cromogeno (Ch)

È possibile che gli strisci colorati mostrino bacilli acido-resistenti, che vengono registrati come “bacilli acido-resistenti” solo nel caso in cui non vengano effettuati test definitivi.¹¹

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Questo terreno è destinato all'isolamento primario. Per i test biochimici e le procedure sierologiche, si raccomanda tuttavia una coltura pura. Per ulteriori informazioni, consultare la documentazione appropriata.^{9–13}

XII PERFORMANCE

In uno studio condotto da Rastogi et al. all'Istituto Pasteur, i risultati del test di sensibilità agli antibiotici dell'Agar 7H11 sono stati comparabili a quelli ottenuti con un metodo radiometrico utilizzando il sistema **BD BACTEC** 460TB. La ricerca ha inoltre giustificato la scelta dell'Agar 7H11 rispetto all'Agar Lowenstein-Jensen per il test tradizionale di sensibilità agli antibiotici.¹⁴

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat. N. Descrizione

221870 **BD BBL** Seven H11 Agar (Deep Fill)

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. Pub. 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. Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. 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. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
12. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Soubolle, 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.
13. Isenberg, H.D., F.D. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. *Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens*. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Rastogi, N., K.S. Goh, and H.L. David. 1989. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion methods using Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 Agar media and a radiometric method. *Res. Microbiol.* 140:405–417.

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



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.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.