

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

Il terreno di Petragrani è utile per l'isolamento e la coltivazione di micobatteri.

II PROCEDURA DEL TEST

A. Procedura per la preparazione degli inoculi

1. Inoculare gli slant di terreno di Lowenstein-Jensen con colture in stock dei ceppi micobatterici pertinenti utilizzando applicatori a bastoncino sterili per inoculazione.
2. Incubare a 35 ± 2 °C le provette con i tappi non completamente avvitati in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica, fino ad ottenere una crescita sostenuta (di solito entro 2 o 3 settimane).
3. Raccogliere la crescita con un applicatore a bastoncino sterile e affilato, rimuovendo delicatamente le cellule dalla superficie del terreno e facendo attenzione a non prelevare con le cellule anche il terreno di coltura.
 - a. Per *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177, procedere come segue.
 - (1) Trasferire la crescita su 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 (diversi minuti) finché la sospensione non risulta priva di grossi grumi.
 - (3) Paragonare tale sospensione allo standard del nefelometro di McFarland n. 1. La sospensione dovrà essere più torbida dello standard.
 - (4) Posizionare la provetta in un portaprovette per 2 o 3 h a temperatura ambiente in modo da far depositare sul fondo le particelle grandi.
 - (5) Trasferire il sovrantante in un contenitore sterile.
 - (6) Regolare la torbidità della sospensione allo standard McFarland n. 1 aggiungendo lentamente brodo Middlebrook 7H9 con glicerolo. Mescolare accuratamente.
 - (7) Prima di utilizzare, diluire a 10^5 UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare con striscio il terreno per test utilizzando un'ansa calibrata da 0,01 mL.
 - b. Per tutti gli altri ceppi micobatterici, procedere come segue.
 - (1) Trasferire la crescita in una provetta da centrifuga sterile con tappo a vite da 50 mL contenente da 8 a 12 microsfere di vetro sterili (diametro 2 mm) e 5 mL di Mycobacterium Diluent preparato come segue.
 - Mescolare i seguenti ingredienti in un matraccio da 1L e regolare il pH, utilizzando idrossido di sodio, a 6,7 – 7,0

Albumina bovina (priva di acidi grassi)	1,0 g
Polisorbato 80	0,1 mL
Acqua purificata	500 mL

 - Sterilizzare con filtrazione a membrana (filtro da 0,2 μ)
 - Dispensare asetticamente in provette sterili piccole con tappo a vite, in aliquote di 5,5 mL.
 - (2) Emulsificare la crescita micobatterica sulla parete laterale di una provetta da centrifuga con tappo a vite utilizzando un applicatore a bastoncino. Mescolare la crescita con il diluente.
 - (3) Tappare la provetta e vortexare per 10 min circa, finché la crescita non risulta ben sospesa e priva di grossi grumi.
 - (4) Aggiungere 15 mL di Mycobacterium Diluent e mescolare accuratamente.
 - (5) Paragonare tale sospensione allo standard del nefelometro di McFarland n. 1. La sospensione dovrà essere più torbida dello standard.
 - (6) Posizionare la provetta in un portaprovette per 2 o 3 h a temperatura ambiente in modo da far depositare sul fondo le particelle grandi.
 - (7) Aspirare il sovrantante e trasferirlo in un contenitore sterile. La sospensione deve presentarsi più torbida dello standard McFarland n. 1 e priva di particelle grandi. Nel caso siano ancora presenti particelle grandi, mescolare e lasciar depositare ancora per 1 h. Trasferire il sovrantante in un contenitore sterile.

- (8) Regolare la torbidità della sospensione allo standard McFarland n.1 aggiungendo lentamente Mycobacterium Diluent. Mescolare accuratamente.
- (9) Dispensare le aliquote di sospensione in flaconi da congelatore con etichetta adatta riportare l'identificazione del microrganismo e la data di preparazione.
- (10) Congelare le sospensioni posizionando 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'utilizzo, prelevare i flaconi congelati e scongelare rapidamente il contenuto mettendo la provetta a bagnomaria a 30 – 35 °C. Prima di utilizzare, diluire a 10⁵ UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare con striscio il terreno per test utilizzando un'ansa calibrata da 0,01 mL.

B. Procedura per testare il terreno

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
 - a. Utilizzando anse calibrate sterili monouso da 0,01 mL, inoculare il terreno utilizzando colture micobatteriche preparate nel modo descritto sopra.
 - b. Incubare a 35 ± 2 °C le provette con i tappi non completamente avvitati in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica.
2. Esaminare la crescita, la selettività e la pigmentazione nelle provette dopo 7, 14 e – se necessario – 21 giorni.
3. Risultati attesi
 - **Mycobacterium tuberculosis* Crescita
H37Ra ATCC 25177
 - **Mycobacterium kansasii*, Crescita
Gruppo I ATCC 12478
 - **Mycobacterium scrofulaceum*, Crescita
Gruppo II ATCC 19981
 - **Mycobacterium intracellulare*, Crescita
Gruppo III ATCC 13950
 - **Mycobacterium fortuitum*, Crescita
Gruppo IV ATCC 6841

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

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette 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 7,0 ± 0,2.
4. Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 e 14 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Il terreno di Petragnani viene utilizzato in procedure qualitative per l'isolamento e la coltivazione di micobatteri da campioni clinici.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il terreno di Petragnani è stato descritto da Norton et al. nell'articolo da loro pubblicato sui metodi di coltura dei bacilli della tubercolosi.^{1,2}

Il terreno di Petragnani è un mezzo di coltura costituito da uovo glicerolato preparato con una base di latte contenente verde malachite. Grazie alle maggiori capacità di inibizione rispetto ai terreni ATS e Lowenstein-Jensen, dovute al più elevato contenuto di coloranti, il terreno di Petragnani è consigliato in particolar modo per i campioni meno recenti o per l'uso insieme ad altri terreni per l'isolamento di bacilli della tubercolosi.²

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il peptone della caseina, il fiore della patata ed il latte scremato contengono amminoacidi, proteine e carboidrati necessari alla crescita dei micobatteri. Il glicerolo è una fonte

d'energia. L'asparagina favorisce l'inizio della crescita ed aumenta il ritmo di crescita. Il tuorlo d'uovo è una fonte di lipidi per il metabolismo dei micobatteri. L'inibizione parziale dei batteri viene ottenuta grazie alla presenza del colorante verde malachite.

VII REAGENTI

Petragnani Medium

Formula approssimata* per L di acqua purificata

L-asparagina	5,1	g
Digerito pancreatico di caseina	5,1	g
Fecola di patate	36,4	g
Latte scremato	100,0	g
Verde malachite	1,2	g
Uovo intero	1277,0	mL
Tuorlo d'uovo	121,0	mL
Glicerolo	60,0	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 linee guide dell'istituto e alle "Precauzioni standard".^{3,6} 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* 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.⁵

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare di congelare e surriscaldare. 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 i tempi di incubazione raccomandati. Portare il terreno a temperatura ambiente prima dell'inoculazione.

Dopo la conservazione in posizione verticale, è possibile che le provette di terreno a base di uovo coagulato mostrino la presenza di una grande quantità d'acqua sul fondo degli slant. Il fluido verrà riassorbito nel terreno se le provette vengono disposte sul lato in modo che il liquido copra la superficie dello slant. Questa posizione di conservazione porta al riassorbimento praticamente completo del fluido in eccesso.

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 specifiche, consultare la documentazione appropriata.^{7,8} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito

Petragnani Medium Slants

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 dei test sono quelle consigliate dai (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 forniti nel kit **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination. Per istruzioni dettagliate sulla decontaminazione e la coltivazione, consultare la bibliografia appropriata.⁸⁻¹¹

Dopo l'inoculazione, conservare i contenitori per test al riparo della luce e posizionarli in un sistema adatto con atmosfera aerobica arricchita di anidride carbonica. Incubare a 35 ± 2 °C.

I terreni inclinati (slant) dovranno essere inoculati in piano orizzontale fino al completo assorbimento dell'inoculo. Per le prime 3 settimane sarà necessario non serrare completamente i tappi a vite delle provette per consentire la circolazione di anidride carbonica per la crescita iniziale. Successivamente, serrare i tappi per evitare la disidratazione e allentarli per un breve periodo una volta alla settimana. Tenere le provette in posizione orizzontale in caso di limitazioni di spazio.

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.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

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

Registrare le osservazioni⁹

1. Numero di giorni necessari perché le colonie diventino macroscopicamente visibili. I microrganismi a crescita rapida sviluppano colonie mature entro 7 giorni. I microrganismi a crescita lenta richiedono più di 7 giorni per la formazione di colonie mature.
2. Produzione di pigmento
Bianco, crema o giallo-marrone = Non cromogenico (NC)
Limone, giallo, arancio, rosso = Cromogenico (Ch)
È possibile che gli strisci colorati mostrino bacilli acido-resistenti, che vengono registrati solo come "bacilli acido-resistenti" nel caso in cui non vengano effettuati 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.^{7,8}

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di . Campioni rappresentativi del lotto vengono inoculati con sospensioni di cellule di micobatteri, preparati in **BBL Middlebrook 7H9 Broth**, diluiti in modo da produrre una crescita da moderata a sostenuta. Le provette vengono incubate a 35 – 37 °C con i tappi non completamente avvitati, per un massimo di 21 giorni in atmosfera arricchita con CO₂.

Su tutti i lotti viene controllato che la colorazione e la morfologia dei microrganismi testati siano corrette.

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
------------	-------------

221389	BBL Petragnani Medium , Conf. da 10 provette misura C
--------	--

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Norton, J.F., J.G. Thomas, and N.H. Broom. 1932. Laboratory tests for tubercle bacilli by culture methods. *Am. Rev. Tuberc.* 25:378-382.
2. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.) 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
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. 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.
12. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL and MycoPrep are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD