



**BBL Seven H11 Agar Slants  
with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate**  
L007501 • Rev. 08 • Gennaio 2011



**PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ**

**I INTRODUZIONE**

BBL Seven H11 Agar è un terreno per l'isolamento e la coltivazione di micobatteri. L'acido aspartico e il piruvato di sodio sono inclusi per migliorare la crescita e la produzione di niacina.

**II PROCEDURA DEL TEST**

**A. Procedura di preparazione degli inoculi**

1. Inoculare gli slant di terreno Lowenstein-Jensen con colture stock dei ceppi micobatterici pertinenti usando bastoncini di inoculo sterili.
2. Incubare le provette – con i tappi non completamente avvitati – a  $35 \pm 2$  °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 sovranatante 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 1 L e correggere il pH a 6,7 – 7,0, usando soluzione 1 N 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 sovrinatante 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 sovrantante 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<sup>5</sup> 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

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
  - a. Prima dell'inoculo, verificare che le superfici agar siano prive di umidità.
  - b. Usando anse calibrate sterili monouso da 0,01 mL, inoculare i contenitori per il test con colture micobatteriche preparate come sopra.
  - c. Incubare tutti i contenitori – con i tappi non completamente avvitati – a 35 ± 2 °C in aerobiosi supplementata con anidride carbonica.
2. Esaminare le provette dopo 7, 14 e – se necessario – 21 giorni per verificare l'entità della crescita e determinare le reazioni. Una coltura deve avere almeno 50 – 100 colonie affinché le performance del test della niacina siano corrette.
3. Performance del test della niacina
  - a. Sullo slant di coltura, dispensare 1,0 mL di brodo Middlebrook 7H9 con polisorbato 80.
  - b. Perforare la superficie dello slant varie volte in maniera tale che il liquido sia a contatto con il terreno. La niacina eventualmente presente viene estratta dal terreno, non dalla crescita batterica.
  - c. Inclinare le provette affinché il brodo copra lo slant. Attendere 30 min per consentire l'estrazione.
  - d. Rimuovere 0,6 mL di estratto e porlo in una provetta sterile da 12 x 75 mm. Dispensare 0,6 mL di brodo Middlebrook 7H9 con polisorbato 80 mm in un'altra provetta da 12 x 75 mm come controllo negativo. Dispensare 0,6 mL di brodo in un'altra provetta da 12 x 75 mm insieme a un disco di controllo per test della niacina Taxo TB come controllo positivo.
  - e. Aggiungere una striscia per test della niacina **Taxo TB** in ciascuna delle provette suddette. Sigillare con cura la provetta subito dopo l'aggiunta della striscia in quanto l'ossigeno altera i risultati.
  - f. Dopo 12 – 15 min (ma prima di 30 min), esaminare il brodo in ciascuna provetta. La comparsa di una colorazione gialla indica un test della niacina positivo, mentre il mancato sviluppo di colorazione è indice di test negativo.

#### 4. Risultati attesi

*\*Mycobacterium tuberculosis*                      Positivo = colorazione gialla  
H37Ra ATCC 25177

*\*Mycobacterium intracellulare*..... Negativo = nessuna variazione cromatica  
Gruppo III ATCC 13950

\*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. 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

**BBL Seven H11 Agar with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate** è usato nell'isolamento e nell'identificazione di micobatteri non cromogeni, in particolare *Mycobacterium tuberculosis*.

### V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Middlebrook e Cohn hanno migliorato la formulazione dell'agar acido oleico-albumina e ottenuto una crescita più rapida e ricca di *Mycobacterium* spp. sul loro terreno, definito 7H10.<sup>1,2</sup> 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.<sup>3</sup> Questa formulazione è stata definita Seven H11 Agar. L'acido aspartico e il piruvato di sodio sono stati aggiunti per migliorare rispettivamente la velocità di produzione della niacina<sup>4</sup> e la crescita.

### 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. 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 verde malachite. Il piruvato di sodio è un fattore stimolante la crescita.

L'acido aspartico è incluso per favorire la reazione della niacina. Tutti i micobatteri producono acido nicotinico (niacina). La presenza di un blocco della via metabolica per la conversione della niacina libera in mononucleotide dell'acido nicotinico fa sì che *M. tuberculosis* accumuli niacina e la elimini nel terreno di coltura, funzione che lo differenzia dalla maggior parte delle altre specie di micobatteri.<sup>4</sup>

### VII REAGENTI

#### **BBL Seven H11 Agar with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate**

Formula approssimata\* per L 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
Acido aspartico .....	1,0	g
Piruvato di sodio .....	5,0	g
Agar .....	13,5	g
Cloruro di sodio.....	0,85	g
Destrosio .....	2,0	g
Albumina bovina V .....	5,0	g
Catalasi .....	3,0	mg
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
Acido oleico.....	0,06	mL
Glicerolo .....	5,0	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 norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".<sup>5-8</sup> 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.<sup>7</sup>

Le procedure di laboratorio che comportano la manipolazione di micobatteri richiedono attrezzature e tecniche speciali volte a minimizzare i rischi biologici.<sup>4,9-11</sup> Per altre precauzioni, vedere "Preparazione del bromuro di cianogeno al 10%" (punto 2 della sezione Procedura del test, Preparazione dei reagenti per il test della niacina).

### **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 i tempi di incubazione raccomandati. 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**

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 informazioni, consultare la documentazione appropriata.<sup>11,12</sup>

## **IX PROCEDURA**

### **Materiale fornito**

BBL Seven H11 Agar Slants with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate

### **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. 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.<sup>4,9-11</sup>

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

Inoculare 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 essere *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.<sup>4</sup> Incubare una coltura duplicata a 35 – 37 °C.

Preparazione dei reagenti per il test della niacina\*\*<sup>4</sup>

1. Preparazione dell'anilina al 4%

Dispensare 4,0 mL di anilina incolore in 96 mL di alcol etilico al 95%. Conservare in un flacone di colore bruno a 2 – 8 °C. Se la soluzione vira al giallo, gettarla e preparare una soluzione di fresco.

2. Preparazione di bromuro di cianogeno al 10%

**ATTENZIONE** - Il vapore di bromuro di cianogeno è altamente irritante ed estremamente velenoso; quando si prepara la soluzione, eseguire tutte le manipolazioni in una cappa chimica e testare quindi le colture in una cappa di sicurezza biologica.<sup>4</sup> **IN CASO DI CONTATTO CON ACIDO, IL BROMURO DI CIANOGENO FORMA GAS CIANURO VELENOSO;**<sup>12</sup> **SMALTIRE I TEST DELLA NIACINA IN UNA SOLUZIONE GERMICIDA RESA ALCALINA MEDIANTE AGGIUNTA DI IDROSSIDO DI SODIO.**

Dissolvere 5 g di bromuro di cianogeno in 50,0 mL di acqua purificata. Conservare in un flacone di colore bruno, ben sigillato, a 2 – 8 °C. Se durante il raffreddamento si forma un precipitato, riscaldare a temperatura ambiente prima di dissolvere. Preparare in quantità limitate perché il reagente è volatile e perde in titolazione. Soluzioni deboli possono dare letture falsamente negative.

\*\*Si raccomanda l'uso della striscia per test della niacina **BBL Taxo TB** anziché preparare i reagenti per il test in laboratorio (strisce per test, n. cat. 231741; **Taxo TB Niacin Test Control**, n. di catalogo 231735). Seguire le istruzioni fornite nel foglietto illustrativo del prodotto.

**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<sup>4</sup>**

Tutti i micobatteri non cromogeni per la produzione di niacina (vedere il punto II, B., 3. sopra); soltanto i ceppi non cromogeni disomogenei devono essere testati per la niacina. Una coltura deve avere almeno 50 – 100 colonie con una crescita di 3 – 4 settimane. *M. tuberculosis* e il più raro *M. simiae* sono di norma niacino-positivi. La maggior parte degli altri micobatteri è niacino-negativa.

**XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

Anche alcuni ceppi di *M. simiae*, BCG e altri micobatteri accumulano niacina. Per confermare l'identificazione di *M. tuberculosis*, si raccomanda di eseguire i test della riduzione del nitrato e della catalasi a 68 °C.<sup>4,11</sup>

**XII PERFORMANCE**

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di Seven H11 Agar Slants with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate. Con l'ausilio di un'ansa calibrata da 0,01 mL, campioni rappresentativi del lotto vengono inoculati con uno striscio di colture diluite per contenere 10<sup>5</sup> unità formanti colonie (UFC) per mL di *Mycobacterium intracellulare* gruppo III (ATCC 13950) ed *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Dopo l'inoculo, le provette vengono incubate – con i tappi non completamente avvitati – a 35 ± 2 °C in atmosfera supplementata con anidride carbonica al 5 – 10%. Dopo 7, 14 e 21 giorni di incubazione, le provette

vengono esaminate per verificare la crescita. Una volta ottenuta una crescita sufficiente (almeno 50 – 100 colonie), le colture vengono testate per la produzione di niacina usando le strisce per test della niacina **Taxo TB**. *M. tuberculosis* è positivo per la produzione di niacina, indicata da una colorazione gialla nel brodo estratto, mentre *M. intracellulare* è negativo (il brodo rimane cioè incolore).

### XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
221958	<b>BBL Seven H11 Agar Slants with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate</b> , confezione da 10 provette di misura A

### XIV BIBLIOGRAFIA

1. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am. J. Public Health*. 48:844-853.
2. 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.
3. 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.
4. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
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. 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.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
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. Lutz, B. 1992. Identification tests for mycobacteria. Part 6, Niacin accumulation, p. 3.12.11-3.12.14. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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