



BBL Lowenstein-Jensen Medium



BBL Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

L007464 • Rev. 11 • Οκτώβριος 2015

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ (Προαιρετικό)

I ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Lowenstein-Jensen Medium χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την καλλιέργεια μυκοβακτηριδίων. Το υλικό αυτό, τοποθετημένο σε σωληνάρια βαθιάς καλλιέργειας, χρησιμοποιείται για την ημιποσοτική εξέταση καταλάσης, ως βοήθεια στην ταξινόμηση των μυκοβακτηριδίων.

II ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

A. Διαδικασία παρασκευής ενοφθαλμισμάτων

1. Ενοφθαλμίστε σωληνάρια κεκλιμένης καλλιέργειας Lowenstein-Jensen Medium με καλλιέργειες παρακαταθήκης των σχετικών μυκοβακτηριδιακών στελεχών με χρήση στειρών μπατονετών ενοφθαλμισμού.
2. Επώαστε τα σωληνάρια με ξεσφιγμένα καπάκια σε αερόβια ατμόσφαιρα συμπληρωμένη με διοξείδιο του άνθρακα στους $35 \pm 2^\circ\text{C}$, έως ότου επιτευχθεί έντονη ανάπτυξη (συνήθως εντός 2 έως 3 εβδομάδων).
3. Συλλέξτε το υλικό της ανάπτυξης με στείρα ακονισμένη μπατονέτα, αφαιρώντας απαλά τα κύτταρα από την επιφάνεια του υλικού καλλιέργειας με προσοχή, έτσι ώστε να μη συμπεριλάβετε υλικό καλλιέργειας με τη συγκομιδή των κυττάρων.

α. Για το *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:

- (1) Μεταφέρετε το υλικό της ανάπτυξης σε 5,0 mL ζυμού Middlebrook 7H9 με γλυκερόλη σε στείρο γυάλινο σωληνάριο με βιδωτό καπάκι, το οποίο περιέχει στείρα γυάλινα σφαιρίδια.
- (2) Υποβάλετε σε περιδίνηση καλά (επί αρκετά λεπτά) έως ότου το εναιώρημα δεν περιέχει πλέον μεγάλα συσσωματώματα.
- (3) Συγκρίνετε το εναιώρημα αυτό με ένα πρότυπο νεφελόμετρου McFarland αρ. 1. Το εναιώρημα θα πρέπει να είναι πιο θολερό από το πρότυπο.
- (4) Τοποθετήστε το σωληνάριο σε βάση επί 2 έως 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να επιτραπεί η καθίζηση των μεγάλων σωματιδίων στον πυθμένα.
- (5) Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε στείρο δοχείο.
- (6) Ρυθμίστε τη θολερότητα του εναιωρήματος έτσι ώστε να ισοδυναμεί με το πρότυπο McFarland αρ. 1, προσθέτοντας αργά στείρο ζυμό Middlebrook 7H9 με γλυκερόλη. Ανακινήστε καλά.
- (7) Αραιώστε έως τα 10^5 CFU/mL πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά και ενοφθαλμίστε με γραμμωτή επίστρωση το υλικό εξέτασης με χρήση βαθμονομημένου κρίκου 0,01 mL.

β. Για όλα τα άλλα μυκοβακτηριδιακά στελέχη:

- (1) Μεταφέρετε το υλικό της ανάπτυξης σε στείρο σωληνάριο φυγοκέντρου 50 mL με βιδωτό καπάκι, το οποίο περιέχει 8 έως 12 στείρα γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 2 mm) και 5 mL αραιωτικού μυκοβακτηριδίων που παρασκευάζεται ως εξής:
 - Αναμείξτε τα ακόλουθα συστατικά σε ένα δοχείο του 1 L και ρυθμίστε το pH, με χρήση υδροξειδίου του νατρίου 1 N, σε 6,7 έως 7,0.

Βόεια αλβουμίνη (χωρίς λιπαρά οξέα)	1,0 g
Polysorbate 80	0,1 mL
Κεκαθαρμένο νερό	500 mL
 - Αποστειρώστε με διήθηση σε μεμβράνη (φίλτρο 0,2 μ)
 - Διανείμετε ασηπτικά σε ποσότητες των 5,5 mL σε στείρα σωληνάρια με βιδωτά καπάκια.
- (2) Γαλακτωματοποιήστε το υλικό μυκοβακτηριδιακής ανάπτυξης στο πλευρικό τοίχωμα ενός σωληναρίου φυγοκέντρου με βιδωτό καπάκι, με χρήση μπατονέτας. Αναμείξτε το υλικό της ανάπτυξης με το αραιωτικό.
- (3) Πωματίστε το σωληνάριο και υποβάλετε σε περιδίνηση επί 10 λεπτά περίπου, έως ότου εναιωρηθεί καλά το υλικό της ανάπτυξης και απαλλαγεί από μεγάλα συσσωματώματα.
- (4) Προσθέστε 15 mL στείρου αραιωτικού μυκοβακτηριδίων και αναμείξτε σχολαστικά.
- (5) Συγκρίνετε το εναιώρημα αυτό με ένα πρότυπο νεφελόμετρου McFarland αρ. 1. Το εναιώρημα θα πρέπει να είναι πιο θολερό από το πρότυπο.
- (6) Τοποθετήστε το σωληνάριο σε βάση επί 2 έως 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να επιτραπεί η καθίζηση των μεγάλων σωματιδίων στον πυθμένα.
- (7) Αναρροφήστε το υπερκείμενο και μεταφέρετέ το σε ένα στείρο δοχείο. Το εναιώρημα πρέπει να είναι πιο θολερό από ένα πρότυπο McFarland αρ. 1 και απαλλαγμένο από

- μεγάλα σωματίδια. Εάν υπάρχουν ακόμα μεγάλα σωματίδια, αναμειξτε το εναιώρημα και αφήστε το να σταθεί επί 1 ώρα επιπλέον. Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε στείρο δοχείο.
- (8) Ρυθμίστε τη θολερότητα του εναιωρήματος έτσι ώστε να ισοδυναμεί με το πρότυπο McFarland αρ. 1 προσθέτοντας αργά στείρο αραιωτικό μυκοβακτηριδίων. Ανακινήστε καλά.
 - (9) Διανείμετε κλάσματα του εναιωρήματος σε φιαλίδια καταψύκτη, τα οποία φέρουν σήμανση με την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού που περιέχουν και την ημερομηνία παρασκευής.
 - (10) Καταψύξτε τα εναιωρήματα τοποθετώντας τα φιαλίδια σε καταψύκτη χαμηλής θερμοκρασίας στους -60°C . Τα φιαλίδια είναι δυνατό να φυλαχθούν επί 6 μήνες το πολύ.
 - (11) Για τη χρήση, αφαιρέστε το κατεψυγμένο φιαλίδιο από τον καταψύκτη και αποψύξτε ταχέως το περιεχόμενο, τοποθετώντας το σωληνάριο σε υδατόλουτρο 30 έως 35°C . Αραιώστε έως τα 10^5 CFU/mL πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά και ενοφθαλμίστε με γραμμωτή επίστρωση το υλικό εξέτασης με χρήση βαθμονομημένου κρίκου $0,01$ mL.

B. Διαδικασίες για την εξέταση υλικών καλλιέργειας

Lowenstein-Jensen Medium Deeps

1. Ενοφθαλμίστε τις επιφάνειες του πυθμένα με στείρο, αναλώσιμο κρίκο ενοφθαλμισμού $0,01$ mL με χρήση καλλιεργείων που παρασκευάζονται όπως περιγράφονται παραπάνω.
2. Επώαστε τα σωληνάρια με ξεσφιγμένα καπάκια στους $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, σε αερόβια ατμόσφαιρα, συμπληρωμένη με διοξείδιο του άνθρακα.
3. Μετά από 14 ημέρες επώασης, προσθέστε σε κάθε καλλιέργεια $1,0$ mL μείγματος polysorbate 80-υπεροξειδίου, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:
 - α. υπεροξείδιο του υδρογόνου 30%. Φυλάσσετε στη συντήρηση του ψυγείου.
 - β. 10% polysorbate 80 παρασκευασμένο ως εξής:
 - (1) Αναμειξτε 10 mL polysorbate 80 με 90 mL κεκαθαμένου νερού.
 - (2) Αποστειρώστε σε αυτόκαυστο στους 121°C επί 10 λεπτά.
 - (3) Φυλάσσετε στη συντήρηση του ψυγείου.
 - γ. Αμέσως πριν από την εκτέλεση της εξέτασης, αναμειξτε ίσα μέρη των δύο διαλυμάτων.
4. Διατηρήστε τις καλλιέργειες σε όρθια θέση επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Μετρήστε (σε mm) το ύψος της στήλης των φυσαλίδων πάνω από την επιφάνεια του υλικού καλλιέργειας.
6. Αναμενόμενα αποτελέσματα

Στήλη φυσαλίδων ύψους μεγαλύτερου από 45 mm.

**Mycobacterium kansasii*, ομάδα I
ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, ομάδα II
ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, ομάδα IV
ATCC 6841

Στήλη φυσαλίδων ύψους μικρότερου από 45 mm.

**Mycobacterium tuberculosis*
H37Ra ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, ομάδας III
ATCC 13950

*Συνιστώμενο στέλεχος μικροοργανισμού για ποιοτικό έλεγχο χρήστη.

Φιαλίδια κεκλιμένης καλλιέργειας και φιάλες με Lowenstein-Jensen Medium

1. Ενοφθαλμίστε αντιπροσωπευτικά δείγματα με τις καλλιέργειες που παρατίθενται παρακάτω.
 - α. Με χρήση στείρων, αναλώσιμων βαθμονομημένων κρίκων $0,01$ mL, ενοφθαλμίστε τα φιαλίδια κεκλιμένης καλλιέργειας ή τις φιάλες με χρήση μυκοβακτηριδιακών καλλιεργείων που παρασκευάζονται όπως περιγράφεται παραπάνω.
 - β. Επώαστε τα δοχεία με ξεσφιγμένα καπάκια στους $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, σε αερόβια ατμόσφαιρα, συμπληρωμένη με διοξείδιο του άνθρακα.
2. Εξετάστε τα σωληνάρια ή τις φιάλες μετά από 7, 14 και 21 ημέρες για ανάπτυξη, εκλεκτικότητα και χρώση.
3. Αναμενόμενα αποτελέσματα
 - α. Για Lowenstein-Jensen Medium

Μικροοργανισμοί ελέγχου της CLSI (στελέχη ATCC)

**Mycobacterium tuberculosis*.....Ανάπτυξη
H37Ra (25177)

**Mycobacterium kansasii*,.....Ανάπτυξη
Ομάδα I (12478)

**Mycobacterium scrofulaceum*,Ανάπτυξη
Ομάδα II (19981)

**Mycobacterium intracellulare*, Ανάπτυξη
Ομάδα III (13950)
**Mycobacterium fortuitum*, Ανάπτυξη
Ομάδα IV (6841)

β. Για Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

**Mycobacterium fortuitum* Ανάπτυξη
ATCC 6841
**Mycobacterium kanasii* Απουσία ανάπτυξης
ATCC 12478

*Συνιστώμενο στέλεχος μικροοργανισμού για ποιοτικό έλεγχο χρήστη.

III ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

1. Εξετάστε τα σωληνάρια ή τις φιάλες όπως περιγράφεται στην ενότητα "Αλλοίωση του προϊόντος".
2. Εξετάστε οπτικά αντιπροσωπευτικά σωληνάρια ή φιάλες για να βεβαιωθείτε ότι τυχόν υπάρχοντα φυσικά ελαττώματα δεν παρεμποδίζουν τη χρήση.
3. Προσδιορίστε το pH ποτενσιομετρικά σε θερμοκρασία δωματίου για την τήρηση της προδιαγραφής του $7,0 \pm 0,2$.
4. Επώαστε τα μη ενοφθαλμισμένα αντιπροσωπευτικά σωληνάρια ή φιάλες στους 20 έως 25 °C και στους 30 έως 35 °C και εξετάστε μετά από 7 και 14 ημέρες για τυχόν μικροβιακή μόλυνση.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

IV ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Το Lowenstein-Jensen Medium χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του *Mycobacterium tuberculosis* και άλλων ειδών μυκοβακτηριδίων.

V ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Ο Lowenstein αρχικά παρασκεύασε ένα υλικό καλλιέργειας μυκοβακτηριδίων στο οποίο ενσωματώθηκε η χρωστική ερυθρό του Κονγκό και πράσινο του μαλαχίτη για τη μερική αναστολή των άλλων βακτηριδίων.^{1,2} Αυτές οι χρωστικές χρησιμοποιήθηκαν παρομοίως και από άλλους ερευνητές, κυρίως τον Sonnenschein³ και τον Hohn.⁴ Στις Η.Π.Α. τα υλικά καλλιέργειας με ιώδες της γεντιανής των Corper⁵ και Petroff⁶ ήταν δημοφιλή, μαζί με το υλικό καλλιέργειας του Petraghiani, το οποίο περιείχε πράσινο του μαλαχίτη. Η σημερινή σύνθεση, η οποία αναπτύχθηκε από τον Jensen,⁷ έχει ελαφρώς διαφορετική περιεκτικότητα σε κιτρικά και φωσφορικά, δεν περιέχει ερυθρό του Κονγκό και έχει αυξημένη συγκέντρωση πράσινου του μαλαχίτη.

Τα παρασκευασμένα από την **BBL** προϊόντα του Lowenstein-Jensen Medium περιλαμβάνουν κεκλιμένες καλλιέργειες σε σωληνάρια για γενική χρήση στην καλλιέργεια των ειδών του γένους *Mycobacterium*, φιάλες για χρήση όταν είναι επιθυμητή μεγαλύτερη περιοχή επιφανείας, καθώς και σωληνάρια βαθιάς καλλιέργειας για την εκτέλεση της ημιποσοτικής εξέτασης καταλάσης. Η τελευταία διαδικασία αναπτύχθηκε από τον Wayne⁸ και είναι χρήσιμη για την ταξινόμηση των μυκοβακτηριδίων.

Επιπλέον, το υλικό καλλιέργειας είναι διαθέσιμο με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου 5% επειδή η ικανότητα ανοχής στο χλωριούχο νάτριο 5% είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα ορισμένων στελεχών μυκοβακτηριδίων (π.χ. *M. fortuitum* και *M. chelonae* subsp. *abscessus*).⁹ Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται ταχέως, το βραδέως αναπτυσσόμενο *M. triviale* και μερικά στελέχη του *M. flavescens* αναπτύσσονται επίσης σε υλικά καλλιέργειας που περιέχουν NaCl. Η αδυναμία ανάπτυξης του *M. chelonae* subsp. *chelonae* βοηθά στη διαφοροποίησή του από τα άλλα μέλη του συμπλέγματος του *M. fortuitum* (π.χ. *M. chelonae* subsp. *abscessus*).^{9,10}

VI ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η βάση του Lowenstein-Jensen Medium είναι μια σχετικά απλή σύνθεση που απαιτεί συμπλήρωση προκειμένου να υποστηριχθεί η ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων. Πριν από τη διεργασία συμπύκνωσης, προστίθεται μείγμα γλυκερόλης και αυγού. Οι ουσίες αυτές παρέχουν λιπαρά οξέα και πρωτεΐνη που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό των μυκοβακτηριδίων. Η πήξη της αλβουμίνης του αυγού κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης παρέχει ένα στερεό υλικό καλλιέργειας για σκοπούς ενοφθαλμισμού.

VII ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Lowenstein-Jensen Medium

Κατά προσέγγιση σύνθεση* ανά 600 mL κεκαθαμένου νερού

Φωσφορικό μονοκάλιο	2,5	g
Θειικό μαγνήσιο	0,24	g
Κιτρικό νάτριο	0,6	g
L-ασπαράγινη	3,6	g
Άλευρο γεωμήλων	30,0	g
Πράσινο του μαλαχίτη	0,4	g

Γλυκερόλη.....12,0 mL
Πλήρες αυγό 1000,0 mL
*Ρυθμισμένο ή/και συμπληρωμένο όπως απαιτείται, έτσι ώστε να πληρούνται τα κριτήρια απόδοσης.

Το Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride (υλικό καλλιέργειας με χλωριούχο νάτριο 5%) περιέχει τα παραπάνω συστατικά με 80 g χλωριούχου νατρίου ανά 600 mL.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Τα σωληνάρια και οι φιάλες με σφισμένα καπάκια θα πρέπει να ανοίγονται προσεκτικά για την αποφυγή τυχόν τραυματισμού λόγω θραύσης του γυαλιού.

Σε κλινικά δείγματα ενδέχεται να υπάρχουν παθογόνοι μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των ιών της ηπατίτιδας και του ιού της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου. Κατά το χειρισμό όλων των ειδών που είναι μολυσμένα με αίμα και άλλα σωματικά υγρά, θα πρέπει να ακολουθούνται οι "Τυπικές προφυλάξεις"¹¹⁻¹⁴ και οι κατευθυντήριες οδηγίες των ιδρυμάτων. Μετά τη χρήση, τα παρασκευασμένα σωληνάρια, τα δοχεία δείγματος και άλλα μολυσμένα υλικά πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο πριν από την απόρριψη.

Για χειρισμούς κλινικών δειγμάτων που δεν παράγουν αερόλυμα, όπως παρασκευή επιχρισμάτων οξεάντοχων μικροοργανισμών, απαιτούνται πρακτικές και διαδικασίες, εξοπλισμός και εγκαταστάσεις περιορισμού βιοασφάλειας επιπέδου 2. Όλες οι δραστηριότητες που δημιουργούν αερολύματα πρέπει να διεξάγονται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας τάξης I ή II. Για εργαστηριακές δραστηριότητες πολλαπλασιασμού και χειρισμού καλλιιεργειών του *M. tuberculosis* και του *M. bovis* απαιτούνται πρακτικές, εξοπλισμός και εγκαταστάσεις περιορισμού βιοασφάλειας επιπέδου 3. Οι μελέτες με πειραματόζωα απαιτούν επίσης ειδικές διαδικασίες.¹³

Οδηγίες φύλαξης

Κατά την παραλαβή, φυλάσσετε τα σωληνάρια και τις φιάλες στο σκότος στους 2 – 8 °C. Αποφεύγετε την κατάψυξη και την υπερβολική θέρμανση. Μην ανοίγετε παρά μόνον όταν είστε έτοιμοι για χρήση. Ελαχιστοποιήστε την έκθεση στο φως. Υλικά καλλιέργειας, που έχουν φυλαχθεί σύμφωνα με την επισήμανση έως ακριβώς πριν από τη χρήση, είναι δυνατό να ενοφθαλμιστούν έως την ημερομηνία λήξης και να επωαστούν για τους συνιστώμενους χρόνους επώασης. Αφήστε το υλικό καλλιέργειας να θερμανθεί σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τον ενοφθαλμισμό.

Αλλοίωση των προϊόντων

Μη χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια ή τις φιάλες εάν παρουσιάζουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης, αποχρωματισμό, ξηρότητα ή άλλα σημεία αλλοίωσης.

VIII ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Δείγματα κατάλληλα για καλλιέργεια είναι δυνατό να υποβληθούν σε χειρισμό με χρήση διαφόρων τεχνικών. Για λεπτομερείς πληροφορίες, συμβουλευτείτε τα κατάλληλα κείμενα.^{15,16} Τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται πριν από τη χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων. Πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για την άμεση μεταφορά στο εργαστήριο.

IX ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρεχόμενο υλικό

Lowenstein-Jensen Medium ή

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Βοηθητικά υλικά καλλιέργειας, αντιδραστήρια, μικροοργανισμοί ποιοτικού ελέγχου και εργαστηριακός εξοπλισμός, όπως απαιτείται.

Διαδικασία της εξέτασης

Εφαρμόζετε άσηπτες τεχνικές.

Οι διαδικασίες εξέτασης είναι εκείνες που συνιστώνται από τα Centers for Disease Control and Prevention (CDC) για πρωτογενή απομόνωση από δείγματα που περιέχουν μυκοβακτηρίδια.¹⁰ Το διάλυμα Ν-ακετυλ-Λ-κυστεΐνης-υδροξειδίου του νατρίου (NALC-NaOH) συνιστάται ως ήπιος, αλλά αποτελεσματικός παράγοντας πέψης και απολύμανσης. Τα αντιδραστήρια αυτά παρέχονται στο **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit (Κιτ πέψης/απολύμανσης δειγμάτων μυκοβακτηριδίων). Για λεπτομερείς οδηγίες απολύμανσης και καλλιέργειας, συμβουλευτείτε τις κατάλληλες αναφορές.^{10, 16-18}

Μετά τον ενοφθαλμισμό, φυλάσσετε τα δοχεία της εξέτασης προστατευμένα από το φως και τοποθετήστε τα σε κατάλληλο σύστημα που παρέχει αερόβια ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με διοξείδιο του άνθρακα. Επωάστε τα ενοφθαλμισμένα φιαλίδια κεκλιμένης καλλιέργειας και τις ενοφθαλμισμένες φιάλες στους $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Τα υλικά κεκλιμένης καλλιέργειας και τα εμφιαλωμένα υλικά καλλιέργειας θα πρέπει να επωάζονται σε οριζόντιο επίπεδο, έως ότου απορροφηθεί το ενοφθαλμισμό. Τα σωληνάρια και οι φιάλες θα πρέπει να έχουν ξεσφιγμένα βιδωτά καπάκια για τις πρώτες 3 εβδομάδες, έτσι ώστε να επιτρέπεται η κυκλοφορία του διοξειδίου του άνθρακα για την έναρξη της ανάπτυξης. Ακολουθώντας, για την πρόληψη τυχόν αφυδάτωσης, σφίξτε τα καπάκια και ξεσφίγγετε τα για λίγο μία φορά την εβδομάδα. Τοποθετήστε τα σωληνάρια σε όρθια θέση εάν δεν υπάρχει επαρκής διαθέσιμος χώρος.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Καλλιέργειες από δερματικές βλάβες για τις οποίες υπάρχει υποψία ότι είναι *M. marinum* ή *M. ulcerans* θα πρέπει να επωάζονται στους 25 έως 33°C για πρωτογενή απομόνωση. Καλλιέργειες για τις οποίες υπάρχει υποψία ότι περιέχουν *M. avium* ή *M. xenopi* εμφανίζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 40 έως 42°C .¹⁰ Επωάστε μια καλλιέργεια εις διπλούν στους 35 έως 37°C .

Η συνιστώμενη διαδικασία για την ημιποσοτική εξέταση καταλάσης με χρήση σωληναρίων βαθιάς καλλιέργειας με άγαρ του Lowenstein-Jensen Medium έχει ως εξής:¹⁰

1. Ενοφθαλμίστε την επιφάνεια του υλικού καλλιέργειας είτε με $0,1\text{ mL}$ καλλιέργειας ζυμού 7 ημερών είτε με ένα γεμάτο κρίκο υλικού ανάπτυξης από μια ενεργώς αναπτυσσόμενη κεκλιμένη καλλιέργεια από κάθε στέλεχος εξέτασης. Ενοφθαλμίστε επίσης σωληνάρια με μια ισχυρή καλλιέργεια μικροοργανισμού που παράγει καταλάση, π.χ. *M. kansasii* και ένα ασθενές στέλεχος παραγωγής ενζύμου, π.χ. το *M. intracellulare*, ως μάρτυρες.
2. Επωάστε, με το καπάκι ξεσφιγμένο, στους $35 \pm 2^\circ\text{C}$ επί 2 εβδομάδες.
3. Παρασκευάστε ένα μείγμα polysorbate 80-υπεροξειδίου με πρόσμειξη ίσων μερών των ακόλουθων:
 - α. Διάλυμα 10% polysorbate 80 σε απεσταγμένο νερό, το οποίο έχει αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο, ή αραιώση 1 mL στείρου polysorbate 80 σε 9 mL απεσταγμένου νερού.
 - β. Υπεροξείδιο του υδρογόνου (30%).
4. Προσθέστε 1 mL του μείγματος polysorbate 80-υπεροξειδίου σε κάθε καλλιέργεια. Μετά από 5 λεπτά, καταγράψτε το ύψος σε mm των στηλών φυσαλίδων.

Η συνιστώμενη διαδικασία για την εξέταση ανοχής στο χλωριούχο νάτριο έχει ως εξής:^{10,17}

1. Παρασκευάστε ένα εναιώρημα μιας ενεργώς αναπτυσσόμενης ανακαλλιέργειας σε ζυμό Middlebrook 7H9, ισοδύναμο με το πρότυπο θολερότητας McFarland αρ. 1.
2. Ενοφθαλμίστε $0,1\text{ mL}$ της τυποποιημένης καλλιέργειας σε μια κεκλιμένη καλλιέργεια του Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride. Παρομοίως, ενοφθαλμίστε μια κεκλιμένη καλλιέργεια του υλικού καλλιέργειας χωρίς το NaCl, ως σωληνάριο ελέγχου ανάπτυξης.
3. Επωάστε με ξεσφιγμένα καπάκια σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO_2 , αρχικά σε επίπεδη βάση στήριξης επί 1 εβδομάδα στους 28 έως 30°C για μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται ταχέως ή στους $35 \pm 2^\circ\text{C}$ για μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται βραδέως.
4. Εξετάζετε την ανάπτυξη μία φορά την εβδομάδα. Συνεχίστε την επώαση επί τρεις ακόμα εβδομάδες, εάν είναι απαραίτητο.

Ποιοτικός έλεγχος χρήστη

Δείτε την ενότητα "Διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου".

Όλες οι παρτίδες υλικών έχουν εξεταστεί με τη χρήση των κατάλληλων μικροοργανισμών ποιοτικού ελέγχου. Η συγκεκριμένη εξέταση πληροί τις προδιαγραφές του προϊόντος και τα πρότυπα του CLSI, σε σχετικές περιπτώσεις. Όπως πάντα, η εξέταση Ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να διενεργείται βάσει οι απαιτήσεις ποιοτικού ελέγχου σύμφωνα με τους ισχύοντες τοπικούς, πολιτειακούς ή ομοσπονδιακούς κανονισμούς ή τις απαιτήσεις πιστοποίησης ή/και τις πρότυπες διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου του εργαστηρίου σας.

X ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρατήρηση των καλλιεργείων πρέπει να γίνεται εντός 5 έως 7 ημερών μετά τον ενοφθαλμισμό και μία φορά την εβδομάδα ακολούθως, επί 8 εβδομάδες το πολύ.

Καταγράψτε τις παρατηρήσεις:

1. Αριθμός ημερών που απαιτούνται για να καταστούν οι αποικίες μακροσκοπικά ορατές. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται ταχέως σχηματίζουν ώριμες αποικίες εντός 7 ημερών. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται βραδέως απαιτούν περισσότερες από 7 ημέρες για το σχηματισμό ώριμων αποικιών.
2. Παραγωγή χρωστικής
Λευκό, κρεμ ή ωχροκίτρινο = μη χρωμογόνο (NC)
Λεμονί, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο = χρωμογόνο (Ch)

Τα χρωματισμένα επιχρίσματα ενδέχεται να εμφανίζουν τους οξεάντοχους βακίλλους, οι οποίοι αναφέρονται μόνον ως “οξεάντοχοι βάκιλλοι”, εκτός εάν πραγματοποιηθούν οριστικές εξετάσεις.

Οι φιάλες είναι δυνατό να εξετάζονται με αναστροφή τους πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα ενός μικροσκοπίου ανατομής. Διαβάστε σε μεγέθυνση 10-60x με εκτεμπόμενο φως. Παρατηρήστε ταχέως σε μεγέθυνση 10-20x για την παρουσία αποικιών. Μπορείτε να διευκολυνθείτε με υψηλότερη μεγέθυνση (30-60x) στην παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών, όπως, π.χ. ελικοειδείς αποικίες.

Στην ημιποσοτική εξέταση καταλάσης, τα περισσότερα μυκοβακτηρίδια εμπίπτουν σε δύο ομάδες.^{8,10,16}

1. Στήλη φυσαλίδων ύψους μεγαλύτερου από 45 mm.

M. chelonae
M. fortuitum
M. gordonae
M. kansasii (κλινικώς σημαντικό)
M. scrofulaceum

2. Στήλη φυσαλίδων ύψους μικρότερου από 45 mm.

M. avium
M. bovis
M. gastri
M. haemophilum
M. intracellulare
M. kansasii (κλινικώς ασήμαντο)
M. malmoense
M. marinum
M. tuberculosis
M. xenopi

Η παρουσία ή η απουσία ανάπτυξης στο σωληνάριο του υλικού καλλιέργειας που περιέχει NaCl 5% βοηθά στη διαφοροποίηση των απομονωμένων στελεχών μυκοβακτηριδίων. Η εξέταση ανοχής στο άλας είναι θετική όταν εμφανίζονται πολυάριθμες αποικίες στο υλικό καλλιέργειας ελέγχου και αναπτύσσονται περισσότερες από 50 αποικίες στο υλικό καλλιέργειας που περιέχει NaCl 5%.^{10,17} Η εμφάνιση αποικιών στο υλικό καλλιέργειας ελέγχου, αλλά η απουσία ορατής ανάπτυξης στο υλικό καλλιέργειας εξέτασης μετά από συνολικά 4 εβδομάδες επώασης, αποτελεί αρνητικό αποτέλεσμα εξέτασης.^{10,16,17}

XI ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Για την ταυτοποίηση, οι μικροοργανισμοί πρέπει να είναι σε καθαρή καλλιέργεια. Για την τελική ταυτοποίηση, θα πρέπει να εκτελούνται μορφολογικές, βιοχημικές ή/και ορολογικές εξετάσεις. Για λεπτομερείς πληροφορίες και τις συνιστώμενες διαδικασίες, συμβουλευτείτε τα κατάλληλα κείμενα.^{15,16,19}

XII ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Lowenstein-Jensen Medium

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Palaci et al., 85 δείγματα του αναπνευστικού ενοφθαλμίστηκαν πάνω σε κεκλιμένες καλλιέργειες Lowenstein-Jensen (LJ) και σε σωληνάρια **BBL MGIT** με πρότυπες διαδικασίες. Είκοσι πέντε (25) δείγματα διαπιστώθηκε ότι είναι θετικά για το *M. tuberculosis*. Η ευαισθησία της καλλιέργειας τόσο για το LJ όσο και το **MGIT** ήταν 96,1% (25 από 26 θετικές καλλιέργειες). Παρότι ο χρόνος έως την ανίχνευση ήταν σημαντικά μικρότερος στα σωληνάρια **MGIT**, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην ευαισθησία της ανίχνευσης του *M. tuberculosis* μεταξύ των δύο μεθόδων.²⁰

Lowenstein-Jensen Medium Deep

Πριν από τη διάθεσή τους, όλες οι παρτίδες των Lowenstein-Jensen Medium Deep εξετάζονται για τα ειδικά χαρακτηριστικά προϊόντος. Τα δείγματα εξετάζονται με τα *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 και *M. tuberculosis* ATCC 25177 με ενοφθαλμισμό με 0,2 mL εναιωρημάτων ζωμού Middlebrook 7H9. Τα σωληνάρια επωάζονται με ξεσφιγμένα καπάκια επί έως 3 εβδομάδες στους 35 – 37 °C. Παρασκευάζεται ένα μείγμα polysorbate 80-υπεροξειδίου και προστίθεται 1 mL σε κάθε καλλιέργεια. Μετά από 5 λεπτά, καταγράψτε το ύψος σε mm των στηλών φυσαλίδων. Στήλη φυσαλίδων ύψους μεγαλύτερου από 45 mm συνεπάγεται θετική αντίδραση καταλάσης. Στήλη φυσαλίδων ύψους μικρότερου από 45 mm συνεπάγεται αρνητική αντίδραση. Με τα *M. fortuitum*, *M. kansasii* και *M. scrofulaceum* παρατηρείται θετική αντίδραση καταλάσης. Με τα *M. intracellulare* και *M. tuberculosis* παρατηρείται αρνητική αντίδραση καταλάσης.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Πριν από τη διάθεσή τους, όλες οι παρτίδες των Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride εξετάζονται για τα ειδικά χαρακτηριστικά προϊόντος. Τα δείγματα εξετάζονται με κυτταρικά εναιωρήματα του *M. fortuitum* ATCC 6841 και του *M. kansasii* ATCC 12478 αραιωμένα σε ζωμό BBL Middlebrook 7H9 για να δώσουν 10^3 έως 10^4 CFU. Τα σωληνάρια επωάζονται με ξεσφιγμένα καπάκια στους 35 – 37 °C επί 7 έως 14 ημέρες σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με CO₂. Με το *M. fortuitum* παρατηρείται μέτρια έως έντονη ανάπτυξη. Με το *M. kansasii* παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης.

XIII ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ

Αρ. κατ. Περιγραφή

221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Mycoflask , χαρτονένιο κουτί των 100 φιαλών
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, συσκευασία των 10 σωληναρίων μεγέθους A
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, χαρτονένιο κουτί των 100 σωληναρίων μεγέθους A

XIV ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Lowenstein, E. 1931. Die Zuchtung der Tuberkelba zillen aus dem stramenden Blute. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 120:127.
2. Lowenstein, E. 1933. Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch auf Malachitgrun Einahrboden. Ann. Inst. Pasteur. 50:161.
3. Sonnenschein. 1930. Dtsch. tierartze. Wehnschr. 38:115.
4. Hohn, J. 1931. Der Z-Einahrboden zur Kultur des Tuberkel-bazillus. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. 121:488-506.
5. Corper, H.J. 1919. The cultivation of recently isolated and laboratory strains of human tubercle bacilli on artificial media. Am. Rev. Tuberc. 3:461-472.
6. Petroff, S.A. 1918. J. Inf. Dis. 23:267.
7. Jensen, K.A. 1932. Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillentammen. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 125:222-239.
8. Wayne, L.G. 1962. Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. Am. Rev. Resp. Dis. 86:651-656.
9. Silcox, V.A., R.C. Good, and M.M. Floyd. 1981. Identification of clinical significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. J. Clin. Microbiol. 14:686-691.
10. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
17. Isenberg, H. (ed.). 2004. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1, 2 and 3, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Carnoch, 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.
19. 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.
20. Palaci, M., S.Y.M., Ueki, D.N. Sato, M.A. Da Silva Tellis, M. Curcio, and E.A.M. Silva. 1996. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube of recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 34:762-764.

Τεχνική Εξυπηρέτηση και Υποστήριξη της BD Diagnostics: παρακαλούμε επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD ή τη διεύθυνση 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