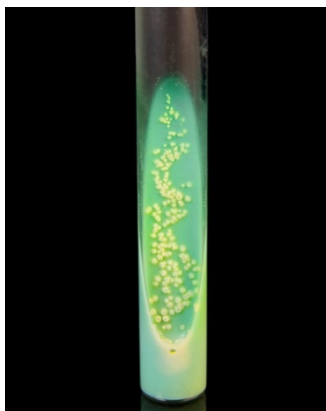




ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER

LÖWENSTEIN-JENSEN MEDIUM BASE

Dehydrerat odlingsmedium



M. kansasii
på Löwenstein-Jensen-medium

1 – AVSEDD ANVÄNDNING

In vitro-diagnostik. För odling och isolering av *Mycobacterium*-arter, särskilt *M. tuberculosis*.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING *

(EFTER REKONSTITUERING MED 1 LITER VATTEN)

Magnesiumsulfat	0,24 g
Magnesiumcitrat	0,60 g
Monokaliumfosfat	2,50 g
L-asparagin	3,60 g
Potatismjöl	30,00 g
Malakitgrönt	0,40 g

*Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de erforderliga prestandakriterierna.

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Det medium som ursprungligen beskrevs av Löwenstein 1931¹ innehöll kongorött och malakitgrönt för att begränsa tillväxten av oönskade bakterier. 1932 modifierade Jensen² mediet genom att ta bort kongorött, ändra koncentrationen av magnesiumcitrat och kaliumfosfat och öka koncentrationen av malakitgrönt. Idag är det allmänt accepterat att användningen av ett äggbaserat medium i kombination med ett flytande medium är avgörande för god laboratoriepraxis vid isolering av mykobakterier³. Bland de äggbaserade medierna är Löwenstein-Jensen-mediet det mest använda i kliniska laboratorier.

I Löwenstein-Jensen-mediet koagulerar äggalbuminet under kokningsprocessen och bildar därmed en fast yta för bakterietillväxt. Koncentrationen av malakitgrönt väljs för att maximera tillväxten av mykobakterier samtidigt som andra mikroorganismer hämmas. L-asparagin och potatismjöl är källor till kväve och vitaminer. Monokaliumfosfat och magnesiumsulfat främjar organismens tillväxt och fungerar som buffertar. Äggsuspensionen tillhandahåller fettsyror och proteiner som krävs för mykobakteriers ämnesomsättning. Glycerol är en koldioxidkälla och gynnar tillväxten av tuberkelbaciller av humant typ, medan den hämmar tillväxten av tuberkelbaciller av bovintyp.

4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM

Lös upp 37,4 g i 600 ml renat vatten, tillsätt 12 ml glycerol och koka upp. Autoklavera vid 121 °C i 15 minuter. Kyl till 50 °C och tillsätt 1 000 ml homogeniserade hela ägg som samlats in aseptiskt. Fördela i sterila rör och varm till 85 °C i lutande läge i 45 minuter eller mer tills mediet stelnar på grund av äggets koagulering (lång lutning, kort botten).

5 – FYSISKA EGENSKAPER

Utseende på dehydraterat medium
Utseende på lösningen
Slutligt pH vid 20–25 °C

från ljus till mörk grönblå, fint, homogent, fritt flytande pulver
grön, ogenomskinlig
ej tillämpligt

6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Löwenstein-Jensen Medium Base	Dehydrerat medium	4016352	500 g (8 L) 21,4
		4016354	5 kg (80 L) 214

7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Autoklav, vattenbad, sterila öglor, nålar och bombullspinnar, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, mikrobiologiska rör, Erlenmeyerkolvar, kycklingägg, glycerol, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

8 – PROVER

Prover som skickas in för mykobakteriell odling delas in i två kategorier:

1 – prover som normalt är kontaminerade med resident flora: majoriteten kommer från luftvägarna, inklusive sputum, trakeal- och bronkialaspirat samt bronkoalveolära lavageprover; andra vanliga provtyper är urin, magaspirat, vävnader och biopsiprover.

2 – Prover från normalt sterila ställen, såsom pleural- och perikardialaspirat.

Kontaminerade prover måste dekontamineras före odling för att minska risken för överväxt av andra organismer än mykobakterier. Prover från normalt sterila ställen bör koncentreras genom centrifugering. Konsultera lämpliga referenser för tillämpliga tekniker.^{3,4} Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. God laboratoriepraxis för insamling, transport och förvaring av proverna bör tillämpas.^{3,4}

9 – TESTFÖRFARANDE

Ta bort eventuellt kondensvatten som finns i botten av slutningen och inokulera slutningens yta med 0,2 ml (3–5 droppar) dekontaminerat och/eller koncentrerat prov.

Luta slutningarna kort för att provet ska kunna inokulera hela ytan. Se till att locken är ordentligt stängda.





Inkubera vid 35 till 37 °C i 6–8 veckor, förläng till 12 veckor om det behövs. 5–10 % CO₂ i luften stimulerar tillväxten av mykobakterier i primära isoleringskulturer. Det är nödvändigt att inkubera under CO₂ med luckrade lock för att främja cirkulationen av koldioxid, endast under de första 7 till 10 dagarna efter inokulering. Därefter kan L-J-odlingarna flyttas till inkubatorer med omgivande luft om utrymmet är begränsat och inkuberas med locken tätt åtskruvade för att förhindra uttorkning av mediet.³

Prover med positivt utstryk som är odlingsnegativa bör behållas i ytterligare 4 veckor. Detsamma bör göras för odlingsnegativa prover som var positiva för mykobakterier vid nukleinsyrabaserade amplifieringsanalyser.³

Odlingarna bör undersökas inom 2 till 5 dagar efter inokulering för att möjliggöra tidig upptäckt av snabbt växande mykobakterier. Unga odlingar (upp till 4 veckor gamla) bör undersökas två gånger i veckan, medan äldre odlingar kan undersökas med veckans mellanrum.³

För prover som tagits från ytliga ställen, såsom huden, eller när läkaren misstänker förekomst av särskilda mykobakteriearter (*M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae* eller *M. haemophilum*), rekommenderas att två uppsättningar odlingsmedier inokuleras, varav den ena inkuberas vid 35–37 °C och den andra vid en lägre temperatur (30–32 °C).

Konsultera lämpliga referenser för detaljerade procedurer om behandling, inokulering och inkubation av kliniska prover.^{3,4}

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation observeras bakterietillväxten och de specifika morfologiska och kromatiska egenskaperna hos kolonierna registreras. *M. tuberculosis* uppträder som korniga, grova, torra kolonier; *M. kansasii* uppträder som släta till grova fotokromogena kolonier; *M. goodii* uppträder som släta gulorange kolonier; *M. avium* uppträder som släta, färglösa kolonier; *M. smegmatis* uppträder som skrynkliga, krämvida kolonier.⁵

Bekräfta förekomsten av syrafasta baciller i positiva odlingar med Ziehl-Nielsen- eller auramin-fenolfärgning.⁴

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll.⁶

Kontrollstammar	Inkubationstemperatur/t/ATM	Förväntade resultat
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	35–37 °C / <21 dagar / CO ₂	tillväxt
<i>M. kansasii</i> grupp I ATCC 12478	35–37 °C / <21 dagar / CO ₂	tillväxt
<i>M. intracellulare</i> grupp III ATCC 13950	35–37 °C / <21 dagar / CO ₂	tillväxt
<i>M. fortuitum</i> grupp IV ATCC 6841	35–37 °C / <21 dagar / CO ₂	tillväxt

ATCC är ett varumärke som tillhör American Type Culture Collection

12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan försäljningen påbörjas testas ett representativt prov av alla partier av dehydratiserat Lowenstein Jensen-medium med avseende på produktivitet genom att resultaten jämförs med ett tidigare godkänt referensparti.

Produktiviteten testas genom att inokulera Lowenstein Jensen-medium med ren odling av följande målstammar: *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. kansasii* grupp I ATCC 12478, *M. scrofulaceum* grupp II ATCC 19981, *M. intracellulare* grupp III ATCC 13950 och *M. fortuitum* grupp IV ATCC 6841. Mykobakteriekulturen inkuberas vid 35–37 °C i en atmosfär med 5–10 % CO₂ och tillväxtens omfattning och koloniernas egenskaper registreras efter 5 dagar. Alla målstammar växer med typiska kolonier.

13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- För att förkorta isoleringstiden så mycket som möjligt och få en snabbare identifiering rekommenderas starkt en kombination av fast medium och flytande medium. Det senare gör det möjligt att minska inkubationstiden och äggbaserade medier möjliggör tillväxt av vissa stammar av *M. tuberculosis*-komplexet och vissa icke-tuberkulösa arter som inte kan utvecklas i flytande medier.⁷
- Det bör noteras att om provvolymen inte är tillräcklig för PCR och odling, bör endast odling utföras. Alla prover, även om de är PCR-positiva, bör skickas för odling.⁴
- M. bovis* växer dåligt eller inte alls på L-J-medium, men växer mycket bättre i medier där glycerol ersätts med natriumpyruvat.⁸
- M. leprae* och *M. genavense* växer inte på L-J-medium.^{3,8}
- En negativ odling utesluter inte en pågående mykobakterieinfektion. Det finns flera faktorer som kan orsaka negativa odlingar även vid förekomst av en infektion: icke-representativt prov, mykobakterier som förstörts under provets nedbrytning och dekontaminering, förekomst av föroreningar som maskerar eller hämmar mykobakteriers tillväxt, otillräckliga inkubationsförhållanden.
- Falskt positiva odlingar kan bero på felmärkning, provbyte under hantering, provöverföring, kontaminerade reagenser eller korskontaminering mellan odlingsrör.³
- L-J-medium innehåller malakitgrönt och är ljuskänsligt och bör inte utsättas för ljus under förvaring.⁸
- L-J-mediet kan uppvisa vissa variationer i den ljusgröna färgen i provröret. Detta påverkar inte mykobakteriernas tillväxt, men färgförändringar som visar ljusgula eller mörkblå zoner kan tyda på kontaminering.⁸
- Förekomsten av gula korn, som beror på äggets lipiddel, påverkar inte mediets prestanda.
- Det rekommenderas att lämpliga identifierings- och känslighetstester utförs på isolat. För detaljerade procedurer, se lämpliga referenser.^{3,4,9}
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningsresultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.

14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Detta odlingsmedium är klassificerat som farligt. Läs säkerhetsdatabladet före användning.
- Tillämpa god tillverkningsmetod vid beredningen av medier i rör eller flaskor.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera oanvänt medium och steriliserade rör som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte odlingsmediet som aktiv ingrediens i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur.





- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- Meddela Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och berörda myndigheter om allvarliga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvaras vid +10 °C / +30 °C på en torr plats, skyddad från direkt ljus. Vid korrekt förvaring kan produkten användas fram till utgångsdatum. Använd inte produkten efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren stängas ordentligt. Kassera produkten om behållaren och/eller locket är skadade, eller om behållaren inte är väl tillsluten, eller vid uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, hårdning, stora klumpar). Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och för valideringen av giltighetstiden för de färdiga produkterna, beroende på typ (rör/flaskor), tillsatta supplement och tillämpad förvaringsmetod (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

- Lowenstein E. Die Zuchtung der Tuberkelba zillen aus dem stramenden Blute. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene Abteilung I Orig 1931; 120:127.
- Jensen KA. Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillientammen. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene Abteilung I Orig 1932; 125:222-239.
- Martin I, Pfyffer GE, Parrish N. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In: Carroll KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
- Public Health England. Investigation of specimens for Mycobacterium species. UK Standards for Microbiology Investigations. B 40, Issue 7.3, 2020.
- Atlas R, Snyder J. Media Reagents and Stains. In: Carroll KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
- CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22-A3 vol. 24 n° 19, 2004.
- Manuale tecnico per la diagnosi microbiologica della tubercolosi: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_614_allegato.pdf.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- Warshauer DM, Salfinger M, Desmond E, Grace Lin SY. Mycobacterium tuberculosis complex. In: Carroll KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.

401635 LÖWENSTEIN-JENSEN MEDIUM BASE

SDS

Förordning (EU) 2020/878

Klassificering

Ögonirritation, kategori 2

Farligt för vattenmiljön, kronisk toxicitet, kategori 3

H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.

H412 Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.

Märkning

Faropiktogram:



Signalord: Varning

Faroangivelser:

H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.

H412 Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.

Skyddsangivelser:

P280 Använd ögonskydd/ansiktsskydd.

P337+P313 Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

P273 Undvik utsläpp till miljön.

Innehåller: Malakitgrönt oxalat

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

REF eller Katalognummer	LOT Batch-kod	IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik	Tillverkare	Använd senast
Temperaturbegränsning	Innehållet räcker till <n> tester	Se bruksanvisningen	Förvara skyddat från direkt ljus	Förvaras torrt





REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Revidering 2	Uppdaterad layout och innehåll	2022/04
Revidering 3	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/04

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

