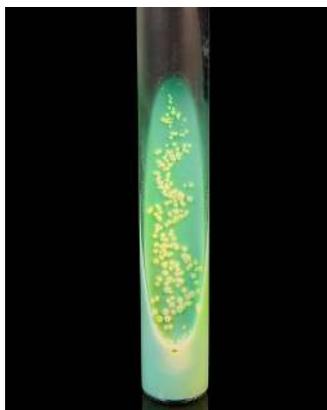


ISTRUZIONI PER L'USO

LÖWENSTEIN-JENSEN MEDIUM

Provette pronte all'uso


M. kansasii
su Lowenstein-Jensen Medium

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno per l'isolamento e la coltivazione dei micobatteri, specialmente *M.tuberculosis*.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Magnesio solfato	0,24 g
Magnesio citrato	0,60 g
Potassio fosfato monobasico	2,50 g
L-asparagina	3,60 g
Farina di patate	30,00 g
Verde malachite	0,40 g
Glicerolo	12 mL
Acqua purificata	600 mL
Emulsione d'uovo	1000 mL

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il terreno originariamente descritto da Löwenstein nel 1931¹ conteneva il rosso congo ed il verde malachite per limitare la crescita dei batteri indesiderati. Jensen, nel 1932², modificò la formula originale sopprimendo il rosso congo, modificando la concentrazione del magnesio citrato e del potassio fosfato ed incrementando il verde malachite.

Oggi è generalmente accettato che l'uso di un terreno a base di uova in combinazione con un terreno liquido sia essenziale per un recupero ottimale dei micobatteri dai campioni clinici³; tra i terreni a base d'uovo, il Lowenstein-Jensen Medium è quello più comunemente usato nei laboratori clinici.

Durante il processo di cottura del Lowenstein-Jensen Medium, l'albumina d'uovo coagula fornendo così una superficie solida per la crescita batterica. La concentrazione di verde malachite è stata studiata per massimizzare la crescita dei micobatteri e per inibire la flora saprofitica. La L-asparagina e la farina di patate sono fonti di azoto e vitamine. Il potassio fosfato monobasico ed il solfato di magnesio favoriscono la crescita dei micobatteri e agiscono da sistema tampone. L'emulsione d'uovo fornisce gli acidi grassi e le proteine necessari per il metabolismo microbico. Il glicerolo è una fonte di carbonio e favorisce la crescita dei micobatteri di origine umana ma non quelli di origine bovina.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in provetta	verde opaco a becco di clarino
pH (20-25°C)	NA

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Lowenstein-Jensen Medium	Provette pronte all'uso	551635	20 provette 18 x145 mm con fondo piatto e tappo a vite; terreno a becco di clarino. Confezionamento in scatola di cartone.

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, materiali per la generazione di una atmosfera d'incubazione controllata (CO₂), terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

I campioni impiegati per la coltura dei micobatteri rientrano in due categorie:

1- campioni normalmente contaminati dalla flora residente, per la maggior parte provenienti dal tratto respiratorio (espettorato, aspirati tracheali e bronchiali e campioni di lavaggio bronco-alveolare); altri tipi di campioni "non-sterili" comunemente impiegati includono urine, aspirati gastrici, tessuti, campioni bioptici.

2- campioni da siti normalmente sterili come aspirati pleurici e pericardici.

I campioni da siti non sterili richiedono una fase di decontaminazione prima della coltura per ridurre la probabilità di crescita eccessiva da parte di organismi diversi dai micobatteri. I campioni provenienti da siti normalmente sterili devono essere concentrati mediante centrifugazione. Consultare i riferimenti appropriati per le tecniche applicabili.^{3,4} Quando possibile, raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.^{3,4}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Rimuovere l'eventuale acqua di condensa presente sul fondo del clarino e inoculare la superficie del terreno con 0,2 mL (3-5 gocce) di campione decontaminato e/o concentrato.

Inclinare leggermente la provetta per consentire al campione di essere assorbito sull'intera superficie del terreno, assicurandosi che i tappi siano ben chiusi.

Incubare a 35-37°C per 6-8 settimane, estendendo fino a 12 settimane se necessario. Un'atmosfera con CO₂ al 5-10% i stimola la crescita dei micobatteri nelle colture di isolamento primario. È necessario incubare in atmosfera di CO₂, con tappi allentati per favorire la circolazione dell'anidride carbonica, solo per i primi 7-10 giorni; successivamente le colture possono essere incubate in aerobiosi con i tappi ben avvitati per prevenire la disidratazione del terreno.³





I campioni con colorazione positiva che risultano negativi alla coltura devono essere incubati per altre 4 settimane. Lo stesso dovrebbe essere fatto per i campioni negativi alla coltura che sono risultati positivi per i micobatteri mediante test molecolare.³

Esaminare le colture entro 2-5 giorni dalla semina per consentire la diagnosi precoce dei micobatteri a rapida crescita. Esaminare le colture giovani (fino a 4 settimane) due volte a settimana, ed esaminare quelle più vecchie ad intervalli settimanali.³

Per i campioni ottenuti da siti superficiali, come la pelle, o quando si sospetta la presenza di particolari specie di micobatteri (*M.marinum*, *M.ulcerans*, *M.chelonae* o *M.haemophilum*), si consiglia di inoculare due serie di terreni, uno dei quali incubato a 35-37°C e uno a temperatura inferiore (30-32°C).

Consultare i riferimenti appropriati per le procedure dettagliate sul trattamento, la semina e l'incubazione dei campioni clinici.^{3,4}

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

M.tuberculosis si presenta come colonie granulari, ruvide, secche; *M.kansasii* appare con colonie fotocromogeniche da lisce a ruvide; *M.gordonae* sviluppa colonie lisce giallo-arancio; *M.avium* cresce come colonie lisce e incolori; *M.smegmatis* sviluppa colonie rugose, bianco-crema.

Confermare la presenza di bacilli acido resistenti nelle colture positive con la colorazione Ziehl-Neelsen o auramina-fenolo.⁴

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.⁵

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	35-37°C / < 21 giorni / CO ₂	crescita
<i>M. kansasii</i> Group I ATCC 12478	35-37°C / < 21 giorni / CO ₂	crescita
<i>M. intracellulare</i> Group III ATCC 13950	35-37°C / < 21 giorni / CO ₂	crescita
<i>M. fortuitum</i> Group IV ATCC 6841	35-37°C / < 21 giorni / CO ₂	crescita

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di provette pronte all'uso di Lowenstein-Jensen Medium e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Lowenstein-Jensen Medium REF 401635) vengono testati per la produttività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività viene testata inoculando gli slant di Lowenstein Jensen Medium con colture pure dei seguenti ceppi target: *M.tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. kansasii* Group I ATCC 12478, *M. scrofulaceum* Group II ATCC 19981, *M.intracellulare* Group III ATCC 13950, *M fortuitum* Gruppo IV ATCC 6841. Le colture dei micobatteri vengono incubate a 35-37°C in atmosfera al 5-10% di CO₂ e l'entità della crescita e le caratteristiche delle colonie vengono registrate dopo 5, 14, 21 giorni. Tutti i ceppi target crescono con colonie tipiche prima di 21 giorni di incubazione.

12 - LIMITI DEL METODO

- Per abbreviare il più possibile il tempo di isolamento e per ottenere un'identificazione più rapida, si consiglia la combinazione di un terreno solido e uno liquido. Quest'ultimo consente di ridurre il tempo di incubazione ed il terreno a base d'uovo consente la crescita di alcuni ceppi del complesso *M. tuberculosis* e di alcune specie non tubercolari che non sono in grado di svilupparsi in terreni liquidi.⁷
- Nel caso che il volume del campione non sia sufficiente per PCR e coltura, è necessario eseguire solo la coltura. Tutti i campioni, anche se positivi alla PCR, devono essere sottoposti alla coltura.⁴
- *M. bovis* è inibito dal glicerolo e non cresce sul terreno L-J. La sua crescita è stimolata nel terreno L-J dove il glicerolo è sostituito dal piruvato di sodio.
- *M.leprae* e *M.genavense* non crescono su L-J Medium.^{3,8}
- La coltura negativa non esclude una infezione in atto da micobatteri. Sono diversi i fattori che possono essere responsabili di colture negative pur in presenza di una infezione: campione non rappresentativo, micobatteri distrutti durante la digestione e decontaminazione del campione; presenza di contaminanti che mascherano o inibiscono la crescita dei micobatteri; condizioni di incubazione inadeguate.
- Risultati falsi positivi possono derivare da etichettatura errata, sostituzione dei campioni durante la manipolazione, trasferimento dei campioni, reagenti contaminati o contaminazione incrociata tra le provette.³
- Il terreno L-J contiene verde malachite ed è fotosensibile e non deve essere esposto alla luce durante la conservazione.
- L-J Medium può mostrare alcune variazioni nel colore verde chiaro lungo il terreno a becco di clarino. Ciò non interferisce con la crescita dei micobatteri; tuttavia, i cambiamenti di colore che mostrano zone giallo brillante o blu scuro possono essere indicativi di contaminazione.
- La presenza di granuli gialli dovuti alla parte lipidica dell'uovo non interferisce con le performances del terreno.
- Si raccomanda di eseguire idonei test di identificazione ed il test di sensibilità sugli isolati. Per le procedure dettagliate consultare i riferimenti appropriati.^{3,4,9}
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.





- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola provetta del prodotto qui descritto è monouso.
- Fare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Il terreno qui descritto non è soggetto a sterilizzazione terminale e deve essere quindi inteso come prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite e riportate sul documento di Controllo Qualità.
- Sterilizzare le provette dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

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

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	02/2021
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 3	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

