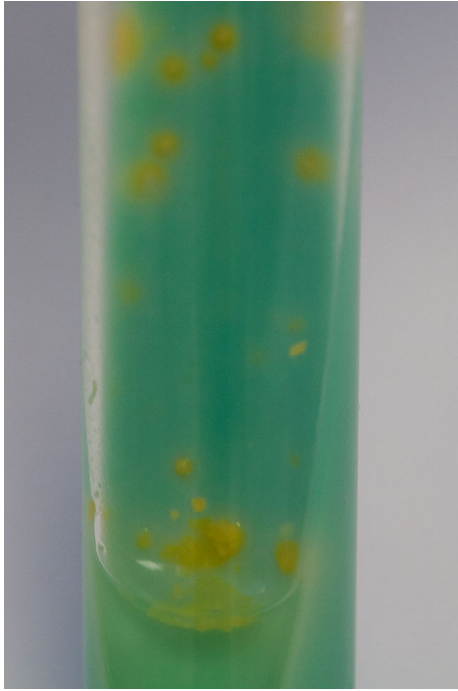




LÖWENSTEIN-JENSEN MEDIUM BASE

Terreno di coltura in polvere



M. kansasii su Lowenstein-Jensen Medium

DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base in polvere da arricchire con glicerolo ed emulsione d'uova, impiegato in provetta per l'isolamento e la coltivazione dei Micobatteri, specialmente *M.tuberculosis*

FORMULA TIPICA (PER 600 ML DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA) ^

Magnesio solfato	0,24
Magnesio citrato	0,60
Potassio fosfato monobasico	2,50
L-asparagina	3,60
Farina di patate	30,00
Verde malachite	0,40

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

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il terreno originariamente descritto da Löwenstein nel 1931 conteneva il rosso congo ed il verde malachite per limitare la crescita dei batteri indesiderati. Jensen, nel 1932, modificò la formula originale sopprimendo il rosso congo, modificando la concentrazione del magnesio citrato e del potassio fosfato ed incrementando il verde malachite. Durante il processo di cottura l'albumina dell'uovo coagula fornendo così una superficie solida per la crescita batterica. L'asparagina e le uova sono fonte di azoto, acidi grassi e proteine; il glicerolo è una fonte di carbonio e favorisce la crescita dei micobatteri di origine umana ma non quelli di origine bovina; il verde malachite agisce come inibente della flora saprofitica.

Per la coltivazione di alcuni ceppi di *Mycobacterium bovis* sensibili al glicerolo si deve omettere nella preparazione del terreno il glicerolo. Oltre che per l'isolamento dei micobatteri, Lowenstein Jensen Medium può essere usato per l'isolamento di *Nocardia* dallo sputo, da lavaggi gastrici o da altri materiali. In combinazione con il terreno di Löwenstein-Jensen è possibile impiegare provette con il substrato reso selettivo dall'aggiunta di antibiotici per limitare lo sviluppo della flora saprofitica. A tal proposito è consigliabile l'impiego del cosiddetto terreno di Lowenstein Jensen-Gruft, preparato aggiungendo al terreno completo penicillina G 50 U/ml, acido nalidissico 35 mg/ml, acido ribonucleico 80 mg/ml, sterilizzati per filtrazione. L'acido ribonucleico è aggiunto per stimolare la crescita dei micobatteri.

PREPARAZIONE

Sospendere 37,4 g di polvere in 600 ml di acqua distillata fredda, aggiungere 12 ml di glicerolo e scaldare per sciogliere il terreno. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere 1000 ml di emulsione d'uovo raccolta sterilmente. Distribuire in provette con tappo a vite e scaldare a 75 °C per 45 minuti in posizione obliqua, fino a che il terreno si sia solidificato per coagulazione dell'uovo.

CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria, verde chiaro, omogenea
Aspetto del terreno in soluzione	Verde pisello limpido
Aspetto del terreno solidificato in provetta	Verde opaco
pH (20-25 °C)	NA

MATERIALI FORNITI

Terreno di coltura in polvere Löwenstein-Jensen Medium Base.

MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, flaconi o beute e provette autoclavabili, bagnomaria, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, glicerolo, uova di gallina, materiali per la generazione dell'atmosfera di incubazione controllata, termostato e strumenti di laboratorio tarati e controllati.

CAMPIONI

La ricerca può essere effettuata su qualsiasi tipo di materiale biologico e permette, in caso di reperimento di *Mycobacterium tuberculosis* complex, di fare diagnosi di tubercolosi. I campioni dovrebbero essere processati entro



poche ore dal momento del loro arrivo in laboratorio; la conservazione è tuttavia possibile a +4°C per un massimo di 2 giorni, periodo per il quale è preservata la vitalità dei micobatteri. Fanno eccezione le emocolture che vanno conservate a temperatura ambiente. Il congelamento dei campioni è da evitare poiché può diminuire la carica dei micobatteri vitali. Il trasporto al laboratorio deve essere il più rapido possibile. Per le modalità di prelievo e trattamento dei campioni e per l'esame microscopico fare riferimento alla bibliografia citata.

PROCEDURA DELL'ANALISI

- Seminare circa 0.2 ml (3-5 gocce) di campione opportunamente decontaminato e/o concentrato, sulla superficie del terreno in provetta dopo aver rimosso l'acqua di condensa eventualmente presente al fondo. Alcuni consigliano di effettuare la semina anche con una diluizione 1/10 del campione per ridurre l'effetto di eventuali sostanze tossiche e per consentire una più accurata visualizzazione e conta delle colonie.
- Incubare a temperatura compresa fra 35 e 37°C in atmosfera con CO₂ a concentrazione compresa tra il 5% e il 10%, in posizione inclinata in modo che il materiale ricopra per intero tutta la superficie dello slant; per campioni di origine cutanea, o quando il clinico sospetti la presenza di particolari specie micobatteriche (*Mycobacterium marinum* o *Mycobacterium ulcerans*), si raccomanda di seminare due set di terreni, di cui uno incubato a 37°C e uno a temperatura inferiore (30-32°C).
- L'incubazione del terreno in atmosfera contenente CO₂ favorisce lo sviluppo dei micobatteri. Durante la prima settimana i tappi devono essere lasciati allentanti per favorire la circolazione della anidride carbonica e dare l'avvio alla crescita. Dopo una settimana richiudere i tappi per evitare la disidratazione del terreno e proseguire l'incubazione con le provette in posizione verticale.
- Protrarre l'incubazione per almeno 6 settimane; in caso di negatività, il prolungamento fino ad 8 settimane è comunque consigliato.
- Ispezionare i terreni di coltura una volta alla settimana.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Osservare la crescita batterica e registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie; l'esame dovrebbe essere eseguito visivamente e con una lente d'ingrandimento

Mycobacterium tuberculosis coltiva sul terreno con colonie larghe, secche, giallastre. *Mycobacterium bovis* cresce modestamente con colonie piccole prive di colore. Fare riferimento ai testi specialistici per l'interpretazione della crescita ottenuta sul terreno e per l'identificazione delle colonie.

Verificare l'alcool-acido resistenza delle colonie eventualmente cresciute sul terreno di coltura eseguendo un preparato microscopico e discriminando così la crescita micobatterica dalle contaminazioni.

È indispensabile giungere all'identificazione di tutti i micobatteri cresciuti in coltura, poiché tale informazione è cruciale per diagnosi e terapia. Per le prove di identificazione e per il test di sensibilità agli antibiotici fare riferimento alla letteratura citata.

CONTROLLO QUALITÀ

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

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE		SPECIFICHE
	T° / T / ATM		
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	37°C / 5 DD / A		Buona crescita, colonie gialle granulose
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	37°C / 5 DD / A		Buona crescita, colonie gialle granulose

A: Aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

LIMITI DEL METODO

- L'esame colturale abbinando al terreno solido un terreno liquido, rappresenta il complemento imprescindibile dell'esame microscopico.
- Per accorciare al massimo i tempi di isolamento ed al fine di ottenere una più rapida identificazione, è fortemente raccomandata la combinazione di un terreno solido e di un terreno liquido. Quest'ultimo ha rivoluzionato i tempi di coltura consentendo di ridurli da 3-6 settimane a 7-14 giorni. Nonostante ciò, i terreni all'uovo come il Löwenstein-Jensen vanno comunque impiegati poiché consentono la crescita di alcuni ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* complex e di alcune specie non tubercolari che non riescono a svilupparsi negli altri terreni.
- Incubare in un termostato a CO₂, non utilizzare il metodo della candela.
- Porre attenzione a proteggere il terreno dalla luce poiché il verde malachite è fotosensibile. Il colore del terreno in provetta può variare da verde chiaro a verde intenso. Scartare le provette che appaiono gialle poiché vi potrebbe essere interferenza nell'interpretazione del colore giallo delle colonie. La presenza di granuli gialli dovuti alla parte lipidica dell'uovo non interferisce con le performances del terreno. La maggior parte dei micobatteri fa virare il colore del terreno al blu.
- *M. bovis* cresce molto scarsamente o non cresce completamente sul terreno di coltura preparato come qui descritto. Non aggiungere glicerolo se si ricercano ceppi bovini o altri ceppi glicerofobici.



- 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.
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni da micobatteri. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I terreni in polvere devono essere manipolati con una adeguata protezione delle vie respiratorie. Prima dell'uso consultare la Scheda di Sicurezza del prodotto.
- 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.
- Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.

CONSERVAZIONE

Conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dall'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi agglomerati).

BIBLIOGRAFIA

- AMCLI gruppo di lavoro micobatteri: Percorso diagnostico della tubercolosi: <http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2018/03/Percorso-Diagnostico-della-Tubercolosi.pdf>
- Mac Faddin, J.F. (1985) Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Manuale tecnico per la diagnosi microbiologica della tubercolosi: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_614_allegato.pdf.
- Sommers, M.H. and J.K. Mc Clatcky (1983) - Laboratory Diagnosis of the Mycobacteriaceae. Cumitech 16, ASM, Washington, D.C.

CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Löwenstein-Jensen Medium Base	Terreno di coltura in polvere	4016352	500 g (8L)

CODICE CND W0104010101



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.