

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

I WPROWADZENIE

Produkt Nutrient Agar (Agar odżywczy) jest uniwersalnym podłożem do hodowli wielu różnorodnych drobnoustrojów bakteryjnych.

II PROCEDURA TESTU

1. Upłynnić podłoże Nutrient Agar w probówkach w rozmiarze A poprzez ogrzanie ich we wrzącej łaźni wodnej. Ochłodzić do temperatury 45 – 50°C, rozlać do płytek Petriego i odczekać co najmniej 30 min na zestalenie się podłoża.
2. Wykonać posiew na płytkach ezami kalibrowanymi do objętości 0,01 mL w celu uzyskania izolowanych kolonii. W przypadku podłoży skośnych w probówkach zaszczerpić powierzchnie podłoży agarowych inokulum zaczerpniętym eżą. Używać rozcieńczeń 10^{-1} hodowli wymienionych poniżej szczepów, hodowanych 18 – 24 h na podłożu **Trypticase Soy Broth**.
3. Inkubować płytki lub probówki w warunkach tlenowych, w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Należy poluzować nakrętki w probówkach zawierających podłoże.
4. Zbadać płytki lub probówki po upływie 18 – 24 h, oceniając stopień wzrostu bakterii.
5. Oczekiwane wyniki

Mikroorganizmy	ATCC	Wzrost
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	Wzrost od umiarkowanego do intensywnego, zielone zabarwienie
* <i>Shigella flexneri</i>	12022	Wzrost od umiarkowanego do intensywnego
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Wzrost od umiarkowanego do intensywnego, kolonie barwy od kremowej do żółtistej

*Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

1. Ocenic probówki według opisu w części „Pogorszenie jakości produktu”.
2. Wzrokowo ocenic reprezentatywne probówki, aby upewnic się, że żadne istniejące wady fizyczne nie będą przeszkadzały w ich użytkowaniu.
3. Inkubować reprezentatywne probówki bez wysianych drobnoustrojów w temperaturze 20 – 25°C i 30 – 35°C i ocenic po 7 dniach pod względem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJA O PRODUKCIE

IV PRZEZNACZENIE

Podłoże Nutrient Agar służy do hodowli bakterii oraz do oceny ilościowej drobnoustrojów bytujących w wodzie, ściekach, kale i innych materiałach.

V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

Na początku XX wieku Amerykańskie Stowarzyszenie Zdrowia Publicznego (American Public Health Association) opublikowało skład uniwersalnego podłoża do hodowli wielu różnorodnych drobnoustrojów o niewielkich wymaganiach odżywczych.¹ Publikacja ta była wyrazem potrzeby opracowania standaryzowanego podłoża do badań wody i ścieków, nabiału oraz różnych rodzajów żywności. Ten stosunkowo prosty skład pożywki oparł się próbie czasu i pod nazwą Nutrient Agar nadal jest wymieniany w aktualnych poradnikach metod badań mikrobiologicznych szerokiej gamy materiałów.²⁻⁵ Ponadto podłoże jest stosowane w badaniach laboratoryjnych do hodowli i podtrzymywania wzrostu gatunków o niewielkich wymaganiach odżywczych.

VI ZASADY PROCEDURY

Podłoże Nutrient Agar składa się z peptonu, wyciągu wołowego i agaru. Ten stosunkowo prosty skład dostarcza składników odżywczych niezbędnych do namnażania dużej liczby drobnoustrojów, których wymagania odżywcze nie należą do skrajnie dużych. Wyciąg wołowy zawiera rozpuszczalne w wodzie substancje, w tym węglowodany, witaminy, organiczne związki azotu oraz sole mineralne. Peptony są zasadniczo źródłem azotu organicznego, zwłaszcza aminokwasów i peptydów o długich łańcuchach. Agar jest czynnikiem zestalającym.

VII ODCZYNNIKI

Nutrient Agar

Przybliżony skład* w przeliczeniu na 1 litr wody oczyszczonej

Trzustkowy hydrolizat żelatyny 5,0 g

Wyciąg wołowy 3,0 g

Agar 15,0 g

*Skorygowany lub uzupełniony zgodnie z wymaganiami kryteriów działania.

Ostrzeżenia i środki ostrożności: Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

Probówki z ciasno dokręconymi nakrętkami należy otwierać ostrożnie, aby uniknąć obrażeń spowodowanych pęknięciem szkła.

Podczas wykonywania wszystkich procedur należy przestrzegać zasad aseptyki i obowiązujących środków ostrożności, dotyczących zagrożenia mikrobiologicznego. Po wykorzystaniu gotowe probówki, pojemniki na próbki oraz inne materiały skażone należy przed wyrzuceniem poddać sterylizacji w autoklawie.

Instrukcje dotyczące przechowywania: Otrzymane probówki umieścić i przechowywać w zaciemnionym miejscu, w temperaturze 2 – 25°C. Unikać zamrażania i przegrzewania. Otwierać dopiero bezpośrednio przed użyciem. W podłożach przechowywanych do momentu użycia w probówkach, zgodnie z instrukcjami podanymi na etykiecie, można wykonywać posiewy do dnia określonego terminem ważności, a następnie prowadzić inkubację przez zalecany czas. Ograniczać do minimum ekspozycję na światło.

Pogorszenie jakości produktu: Nie używać probówek, jeżeli są widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, zmiana zabarwienia, wysychanie lub inne, świadczące o pogorszeniu jakości.

VIII POBIERANIE PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z NIMI

Dostępne są różne techniki postępowania z próbkami umożliwiającymi uzyskanie hodowli. Szczegółowe informacje znajdują się w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.^{6,7} Probki należy uzyskać przed zastosowaniem środków przeciwbakteryjnych. Konieczne jest zapewnienie szybkiej dostawy do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczane materiały: Nutrient Agar

Materiały wymagane, ale niedostarczane: Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki, drobnoustroje do kontroli jakości i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Procedura testowa: Stosować techniki aseptyczne.

Upłynnić podłoże agarowe w probówkach w rozmiarze A, ochłodzić do temperatury 45 – 50°C i rozlać do płytek Petriego. Odczekać co najmniej 30 min na zestalenie się podłoża. Wykonać posiew próbki możliwie jak najszybciej po dostarczeniu materiału do laboratorium. Płytkę do posiewu służy przede wszystkim do izolowania czystych hodowli z próbek zawierających florę mieszaną. Innym sposobem, jeżeli materiał jest hodowany bezpośrednio z wymazu, jest przetoczenie wymazówki po niewielkiej powierzchni krawędzi płytki, a następnie posiew pasmowy z zaszczepionego obszaru. Inkubować płytki w temperaturze 35 ± 2°C 18 – 24 h, a w razie konieczności 42 – 48 h.

Podłoża skośne w probówkach służą głównie do hodowli i podtrzymywania wzrostu czystych kultur. Należy je zaszczepiać eż i inkubować w tych samych warunkach, co podłoża na płytkach.

Kontrola jakości przez użytkownika: Patrz „Procedury kontroli jakości”.

Należy postępować zgodnie z obowiązującymi wymogami kontroli jakości, wynikającymi z przepisów miejscowych, krajowych lub federalnych, wymogami akredytacji i rutynowymi procedurami kontroli jakości w danym laboratorium. Zaleca się, aby użytkownik stosował się do odpowiednich wytycznych CLSI (dawniej NCCLS) i przepisów CLIA, dotyczących sposobów kontroli jakości.

X WYNIKI

Po inkubacji na większości płytek pojawiają się obszary zlewnego wzrostu. W miejscach posiewu pasmowego drobnoustroje występują w zmniejszonej ilości, ponieważ procedura posiewu pasmowego w rzeczywistości stanowi technikę „rozcieńczeniową”. Wskutek tego w kilku miejscach powinny znajdować się wyizolowane kolonie drobnoustrojów zawartych w próbce. Wzrost wszystkich drobnoustrojów można dalej oceniać półilościowo na podstawie wzrostu w każdym posianym pasmowo obszarze.

Rosnące drobnoustroje z probówek zaszczepionych czystymi hodowlami można wykorzystywać do badań biochemicznych i/lub serologicznych.

XI OGRANICZENIA PROCEDURY

Do identyfikacji niezbędne są czyste kultury drobnoustrojów. W celu ostatecznej identyfikacji należy przeprowadzić badania morfologiczne, biochemiczne i/lub serologiczne. W celu uzyskania szczegółowych informacji oraz zalecanych procedur należy zapoznać się z odpowiednimi pozycjami piśmiennictwa.⁶⁻⁸

XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Przed dopuszczeniem do obrotu wszystkie partie podłoża Nutrient Agar sprawdza się pod względem ich skuteczności. Za pomocą ezy skalibrowanej do objętości 0,01 mL reprezentatywne próbki z danej partii są zaszczipiane pasmowo rozcieńczeniami 10^{-1} hodowli szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), rosnącymi na podłożu **Trypticase** Soy Broth. Zaszczepione pojemniki są inkubowane z poluzowanymi nakrętkami w temperaturze $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Po upływie 18 – 24 h inkubacji kontroluje się pojemniki, oceniając wzrost i zabarwienie kolonii. Wszystkie hodowle wykazują wzrost od umiarkowanego do intensywnego; kolonie *P. aeruginosa* odznaczają się zielonym zabarwieniem; kolonie *S. aureus* mają barwę od kremowej do złocistej.

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Nr kat.	Opis
220971	BD BBL Nutrient Agar Slants, karton zawierający 100 probówek w rozmiarze K
298235	BD BBL Nutrient Agar Slants, karton zawierający 100 probówek w rozmiarze D
220968	BD BBL Nutrient Agar Deeps (Pour Tubes), 20 mL, opakowanie zawierające 10 probówek typu A

XIV PIŚMIENNICTWO

1. American Public Health Association. 1917. Standard methods of water analysis, 3rd ed. American Public Health Association, New York.
2. U.S. Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
3. Clesceri, L.S., A.E. Greenberg, and A.D. Eaton (ed.). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
4. Horwitz, W. (ed.). 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed, vol.1. AOAC International, Gaithersburg, MD.
5. Downes and Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
6. 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.
7. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
8. 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.

Dział Obsługi Technicznej firmy BD Diagnostics: należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem BD lub odwiedzić stronę 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, BBL, GasPak and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2014 BD.