

KVALITETSKONTROLPROCEDURER

I INDLEDNING

BD BBL Seven H11 Agar er et dyrkningsmedium til isolering og dyrkning af mykobakterier.

II FUNKTIONSTESTPROCEDURE

1. Indpod repræsentative prøver med de dyrkninger, der er anført nedenfor.
 - a. Sørg for, at pladerne er fri for fugt inden podning.
 - b. Udstryg pladerne til isolering med en kultur fortyndet til at give 10^3 – 10^4 CFU.
 - c. Inkubér pladerne ved 35 ± 2 °C i en aerob atmosfære tilsat kuldioxid.
2. Undersøg pladerne efter 7 til 21 dage for tegn på vækst og pigmentering.
3. Forventede resultater
Kontrolorganismer (ATCC stammer)

Organismer	ATCC stammer	Isolering
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Moderat til kraftig vækst
* <i>Mycobacterium kansasii</i> gruppe I	12478	Vækst
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , gruppe II	19981	Vækst
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , gruppe III	13950	Vækst
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , gruppe IV	6841	Vækst

*Anbefalet organismestamme til bruger kvalitetskontrol.

BEMÆRK: Skal monitoreres af brugeren i overensstemmelse med CLSI M22-A3.

III YDERLIGERE KVALITETSKONTROL

1. Undersøg pladerne som beskrevet under "Produkt nedbrydning".
2. Undersøg repræsentative plader visuelt for at sikre, at eventuelle eksisterende fysiske defekter ikke vil påvirke anvendelsen.
3. Bestem pH med potentiometrisk titrering ved stuetemperatur for at overholde specifikationen på $6,6 \pm 0,2$.
4. Observer pladernes fasthed under podningsprocedurerne.
5. Inkubér ikke-podede repræsentative plader ved 35 ± 2 °C i 72 h, og undersøg dem for tegn på mikrobiel kontaminering.

PRODUKTINFORMATION

IV TILSIGTET BRUG

BD BBL Seven H11 Agar bruges i forbindelse med kvalitative procedurer til isolering og dyrkning af mykobakterier. Pladerne er dybe (deep-filled) for at reducere effekten af tørring ved længerevarende inkubation.

V RESUMÉ OG FORKLARING

Der er hidtil blevet udviklet en række forskellige medier til dyrkning af mykobakterier. De første formuleringer var æg-baserede, bl.a. Lowenstein-Jensen medium og Petragnani medium. Dubos og Middlebrook tog del i udviklingen af en række formuleringer indeholdende oleinsyre og albumin som hovedbestanddele, der medvirkede til tuberkelbacillens vækst og beskyttede organismen mod forskellige giftstoffer.¹ Senere forbedrede Middlebrook og Cohn formuleringen af oleinsyre og albuminagar og opnåede en hurtigere, mere frodig vækst af mykobakterie-arten på deres medium, kaldet 7H10.^{2,3}

Cohn et al. modificerede 7H10 Agar formuleringen ved at tilsætte ét gram pankreatisk caseinopløsning pr. liter med det formål at forbedre væksten af stammer af *Mycobacterium tuberculosis*, som havde vist sig at have ringe vækst (eller ingen vækst) på 7H10 og andre traditionelle isoleringsmedier.⁴ Denne formulering kaldes **BD BBL Seven H11 Agar**. I en undersøgelse foretaget af Cohn et al. af 96 kliniske isolater mislykkedes vækstforsøg med 13 isolater på 7H10 mediet inden for de første tre uger. Af de 13 dyrkninger voksede 10 på Seven H11 mediet inden for tre uger. De andre tre krævede yderligere tre ugers inkubation, før der var synlige tegn på vækst.⁴

VI PROCEDURENS PRINCIPPER

BD BBL Seven H11 Agar indeholder en række uorganiske salte, som tilfører substanser, der er kritiske for mykobakteriers vækst. Når natriumcitrat omdannes til citronsyre, fastholder det visse uorganiske kationer i en opløsning. Glycerol udgør en rig kulstof- og energikilde. En pankreatisk caseinopløsning er en rig nitrogenkilde, der medvirker til vækst af tuberkelbaciller og er ansvarlig for en række andre vækstfaktorer.¹ Oleinsyre – foruden andre langkædede fedtsyrer – kan udnyttes af tuberkelbacillerne og spiller en vigtig rolle for mykobakteriers stofskifte. Catalase nedbryder de giftige peroxider, der kan være til stede i mediet. Albuminets vigtigste rolle er at beskytte tuberkelbaciller mod giftstoffer, og således forbedrer albuminets bacillernes restitution ved primær isolering. Delvis bakteriehæmning opnås, hvis malachitgrønt farvestof er til stede.

VII REAGENSER

BD BBL Seven H11 Agar

Omtrentlig formel* pr. liter rensset vand

Pankreatisk casein opløsning.....	1,0 g	Bovint albumin V.....	5,0 g
Magnesiumsulfat	0,05 g	Catalase	3,0 mg
Jern-ammoniumcitrat.....	0,04 g	Pyridoxin.....	1,0 mg
Natriumcitrat	0,4 g	Zinksulfat	1,0 mg
Ammoniumsulfat	0,5 g	Kobbersulfat	1,0 mg
Mononatriumglutaminat	0,5 g	Biotin.....	0,5 mg
Dinatriumfosfat	1,5 g	Calciumchlorid.....	0,5 mg
Monokaliumfosfat	1,5 g	Malachit grønt.....	0,25 mg
Agar	13,5 g	Oleinsyre	0,06 mL
Natriumklorid	0,85 g	Glycerin	5,0 mL
Dextrose	2,0 g		

*Justeret og/eller suppleret som påkrævet for at leve op til præstationskriterier.

Advarsler og forholdsregler

Til *in vitro* diagnostik.

Hvis der ses for stor fugtighed, inverteres bunden over et forskudt låg, hvilket giver mulighed for lufttørring for at forhindre dannelse af en forsegling mellem toppen og bunden af pladen under inkubation.

Patogene mikroorganismer, inklusive hepatitisvira og humant immundefekt virus, kan forekomme i kliniske prøver.

"standardforholdsregler"⁵⁻⁸ og institutionelle retningslinier skal overholdes ved håndtering af alle emner, der er kontamineret med blod og andre kropsvæsker. Efter brug skal præparerede plader, prøvebeholdere og andre kontaminede materialer steriliseres ved autoklavering, inden de kasseres.

Biosikkerhedsniveau 2-praksis og procedurer, samt opbevaringsudstyr og -faciliteter er påkrævet til ikke-aerosol-producerende håndtering af kliniske prøver, såsom forberedelse af syrefaste udstrygninger. Alle aerosoludviklende aktiviteter skal udføres i et Klasse I eller II biologisk sikkerhedsskab. Biosikkerhedsniveau 3-praksis, samt opbevaringsudstyr og -faciliteter er påkrævet i forbindelse med laboratorieaktiviteter, der involverer formering og håndtering af kulturer af *M. tuberculosis* og *M. bovis*. Dyreundersøgelser kræver også specielle procedurer.⁷

Opbevaringsinstruktioner

Opbevares efter modtagelse i mørke ved 2–8 °C. Undgå nedfrysning eller overopvarmning. Må ikke åbnes inden brugstidspunktet.

Begræns lyspåvirkning til det mindst mulige. Klargjorte plader, der opbevares i deres originale emballage ved 2–8 °C indtil lige før brug, kan inokuleres indtil udløbsdatoen og inkuberes i de anbefalede inkubationstider (mycobakteriologiske medier: op til 8 uger). Lad mediet opnå stuetemperatur inden inokulering.

Produktnedbrydning

Pladerne må ikke anvendes, hvis de viser tegn på mikrobiel kontaminering, misfarvning, udtørring eller andre tegn på nedbrydning.

VIII PRØVEINDSAMLING OG -HÅNTERING

En række swabs og beholdere er tilgængelige til prøveindsamling. Prøverne skal tages, inden antimikrobiel behandling finder sted.

Nødvendige foranstaltninger skal træffes m.h.t. øjeblikkelig overførsel til laboratoriet. Der fås flere slags opbevaringsmedier eller transportsystemer, såsom **BD BBL** prøvetagnings- og transportprodukter, som forlænger mikroorganismens levetid, hvis der forventes betydelige forsinkelser mellem tidspunktet for prøvetagningen og den definitive dyrkning.

Der henvises til passende litteratur for detaljer om prøveindsamling og håndteringsmetoder.^{9,10}

IX PROCEDURE

Materiale vedlagt

BD BBL Seven H11 Agar (Deep Fill)

Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

Hjælpedyrkningsmedier, reagenser, kvalitetskontrolorganismer og laboratorieudstyr, som påkrævet.

Testprocedure

Agaroverfladen skal være glat og fugtig, men uden overdreven fugt.

Testprocedurene er de af Centers for Disease Control (CDC) anbefalede procedurer til primær isolering fra prøver indeholdende mykobakterier.¹¹ En N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid (NALC-NaOH) opløsning anbefales som et mildt, men effektivt opløsende og dekontaminerende middel. Reagenserne leveres i et **BD MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/ Decontamination kit. Der henvises til passende litteratur⁹⁻¹² vedrørende detaljerede anvisninger til dekontaminering og dyrkning.

Efter podning beskyttes pladerne mod lys, og de placeres med mediumsiden nedad i en

BD GasPak EZ system eller et andet egnet system, som giver en aerob atmosfære beriget med kuldioxid og de inkuberes ved 35 ± 2 °C.

BEMÆRK: Dyrkninger fra hudlæsioner, der mistænkes for at være *M. marinum* eller

M. ulcerans, skal inkuberes ved 25 til 33 °C for primær inkubation. Mistænkte dyrkninger indeholdende *M. avium* eller *M. xenopi* udviser optimal vækst ved 40 til 42 °C.¹¹ Inkubér en duplikeret dyrkning ved 35 til 37 °C.

Bruger kvalitetskontrol

Krav til kvalitetskontrol skal udføres i overensstemmelse med gældende lokale og/eller nationale regulativer eller akkrediteringskrav samt laboratoriets standard kvalitetskontrolprocedurer. Det anbefales at læse de relevante CLSI retningslinjer og CLIA-regulativer mht. passende kvalitetskontrolprocedurer.

X RESULTATER

Pladerne kan aflæses inden for 5 til 7 dage efter indpodning og én gang om ugen herefter i op til 8 uger.

Pladerne aflæses ved at invertere dem under et dissektionsmikroskop. Aflæses ved 10–60x med gennemfaldende lys. Scan pladerne hurtigt ved 10–20x for tilstedeværelse af kolonier. Stærkere forstørrelse (30–60x) hjælper til at observere kolonimorfologi, dvs. slangelinie-agtige kolonier.

Notér observationer:¹¹

1. Antal dage, der kræves, før kolonierne er synlige makroskopisk.

2. Antal kolonier:

Ingen kolonier = negativ

Færre end 50 kolonier = aktuelle tælling

50–100 kolonier = 1+

100–200 kolonier = 2+

Næsten konfluente (200–500) = 3+

Konfluente (over 500) = 4+

3. Pigmentproduktion

Hvid, flødefarvet eller gulbrun = ikke-kromogen (NC)

Citrongul, gul, orange, rød = kromogen (Ch)

Farvede udstrykningspræparater kan udvise syrebestandige baciller, som kun rapporteres som "syrebestandige baciller", medmindre der udføres definitive tests.¹¹

XI PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Dette medium er beregnet til primær isolering. Dog anbefales en ren dyrkning til biokemiske tests og serologiske procedurer.

Der henvises til den relevante litteratur for yderligere oplysninger.^{9–13}

XII FUNKTIONSDATA

I en undersøgelse foretaget af Rastogi et al. på Pasteur Institutet svarede resultaterne af følsomhedstests af medikamenter for 7H11 Agar til en radiometrisk metode anvendende **BD BACTEC** 460TB systemet. Undersøgelsen retfærdiggjorde yderligere valget af 7H11 fremfor Lowenstein-Jensen Agar til almindelige følsomhedstests.¹⁴

XIII BESTILLING

Kat. nr.	Beskrivelse
221870	BD BBL Seven H11 Agar (Deep Fill)

XIV LITTERATUR

1. Dubos, R.J., and G. Middlebrook. 1947. Media for tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* 56:334–345.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am. J. Pub. Health.* 48:844–853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, W.E. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* 38:66–81.
4. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 98:295–296.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. Metchock, B.G., F.S. Nolte, and R.J. Wallace, Jr. 1999. *Mycobacterium*, p. 399–437. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
12. Cernoch, 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.
13. Isenberg, H.D., F.D. Schoenkecht, and A. von Graevenitz. 1979. *Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens*. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Rastogi, N., K.S. Goh, and H.L. David. 1989. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion methods using Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 Agar media and a radiometric method. *Res. Microbiol.* 140:405–417.

Teknisk service og support: skal De kontakte den lokale BD repræsentant eller besøg www.bd.com.



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.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.