

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

I INTRODUÇÃO

O **BD BBL Seven H11 Agar** é um meio de cultura para isolamento e crescimento de micobactérias.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

- Inocule as amostras representativas com as culturas listadas abaixo.
 - Antes da inoculação, certifique-se de que as placas não contêm humidade.
 - Utilizando uma cultura diluída de forma a produzir 10^3 – 10^4 UFC/placa, faça riscas sobre o ágar para isolamento.
 - Incube as placas a 35 ± 2 °C numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono.
- Examine as placas após 7 a 21 dias, verificando se existe crescimento e pigmentação.
- Resultados esperados

Microrganismos	ATCC	Isolamento
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Crescimento moderado a intenso
* <i>Mycobacterium kansasii</i> Grupo I	12478	Crescimento
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , Grupo II	19981	Crescimento
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , Grupo III	13950	Crescimento
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , Grupo IV	6841	Crescimento

*Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

NOTA: Deverá ser monitorizado pelos utilizadores de acordo com CLSI M22-A3.

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

- Examine as placas, conforme descrito em “Deterioração do produto”.
- Examine visualmente as placas representativas, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.
- Determine o pH, através de potenciometria, à temperatura ambiente, para cumprimento da especificação de pH de $6,6 \pm 0,2$.
- Durante o procedimento de inoculação, tenha atenção à solidez das placas.
- Incube as placas representativas não inoculadas a 35 ± 2 °C durante 72 h e examine-as, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BD BBL Seven H11 Agar** (Ágar Seven H11) é utilizado em procedimentos qualitativos para isolamento e crescimento de micobactérias. As placas são cheias com grande profundidade de meio para reduzir os efeitos da secagem durante o período de incubação prolongado.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

Têm sido criados muitos meios de cultura para micobactérias. Os primeiros meios eram formulações à base de ovo e incluíam o Meio Lowenstein-Jensen e o Meio Petragnani. Dubos e Middlebrook contribuíram para o desenvolvimento de várias formulações que continham como ingredientes chave o ácido oleico e a albumina, para ajudar no crescimento de bacilos da tuberculose e proteger os microrganismos contra diversos agentes tóxicos.¹ Subsequentemente, Middlebrook e Cohn melhoraram a formulação do ágar de ácido oleico e albumina e obtiveram um crescimento mais rápido e mais exuberante de espécies de *Mycobacterium* no seu meio, designado como 7H10.^{2,3}

Cohn et al. modificaram a formulação do Ágar 7H10 através da adição de um grama de digerido pancreático de caseína por litro, de forma a aumentar o crescimento de estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* que cresciam pouco (ou mesmo nada) no meio 7H10 e noutros meios de isolamento convencionais.⁴ Esta formulação foi designada como **BD BBL Seven H11 Agar**. Num estudo realizado por Cohn, et al. em 96 isolados clínicos, 13 não cresceram no meio 7H10 nas primeiras três semanas. Destas 13 culturas, 10 cresceram em meio Seven H11 num período de três semanas; as outras três necessitaram de um período de incubação adicional de três semanas para aparecimento de crescimento visível.⁴

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **BD BBL Seven 7H11 Agar** contém vários sais inorgânicos que fornecem substâncias essenciais para o crescimento de micobactérias. O citrato de sódio, quando convertido para ácido cítrico, serve para conservar alguns catiões inorgânicos em solução. O glicerol é uma fonte abundante de carbono e energia. O digerido pancreático de caseína é uma fonte rica em nitrogénio para o crescimento dos bacilos da tuberculose e fornece inúmeros factores de crescimento adicionais.¹ O ácido oleico, bem como outros ácidos gordos de cadeia longa, pode ser utilizado pelos bacilos da tuberculose e desempenha um papel importante no metabolismo das micobactérias. A catalase destrói os peróxidos tóxicos que possam estar presentes no meio. O principal efeito da albumina é a protecção dos bacilos da tuberculose contra agentes tóxicos, aumentando assim o seu isolamento em meios primários. A inibição parcial de bactérias é conseguida pela presença do corante verde de malaquite.

VII REAGENTES

BD BBL Seven H11 Agar

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Digerido pancreático de caseína	1,0 g	Albumina bovina V	5,0 g
Sulfato de magnésio	0,05 g	Catalase	3,0 mg
Citrato de amónio férrico	0,04 g	Piridoxina	1,0 mg
Citrato de sódio	0,4 g	Sulfato de zinco	1,0 mg
Sulfato de amónio	0,5 g	Sulfato de cobre	1,0 mg
Glutamato monossódico	0,5 g	Biotina	0,5 mg
Fosfato dissódico	1,5 g	Cloreto de cálcio	0,5 mg
Fosfato monopotássico	1,5 g	Verde de malaquite	0,25 mg
Ágar	13,5 g	Ácido oleico	0,06 mL
Cloreto de sódio	0,85 g	Glicerol	5,0 mL
Dextrose	2,0 g		

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Caso seja observada humidade excessiva, deve inverter a parte inferior da placa sobre uma tampa inclinada e deixar secar ao ar para evitar a formação de um selo entre a parte superior e a parte inferior da placa durante a incubação.

Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"⁵⁻⁸ e as linhas de orientação da instituição. Após a utilização e antes de serem eliminados, as placas preparadas, os recipientes de amostras e outros materiais contaminados devem ser esterilizados em autoclave.

Para a preparação de amostras clínicas não produtoras de aerossóis, tais como a preparação de esfregaços ácidos rápidos, é necessária a adopção de práticas e procedimentos e a utilização de equipamentos e instalações de contenção do Nível 2 de Segurança Biológica. Todas as actividades que envolvam a produção de aerossóis devem ser executadas numa câmara de segurança biológica de Classe I ou II. Para as actividades laboratoriais que envolvam a propagação e manipulação de culturas de *M. tuberculosis* e *M. bovis* são necessárias as práticas, equipamento de contenção e instalações do Nível 3 de Segurança Biológica. Os estudos em animais também requerem procedimentos especiais.⁷

Instruções de armazenamento

Após a recepção, armazenar as placas no escuro a uma temperatura de 2 a 8 °C. Evitar congelar e aquecer excessivamente. Abra apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. As placas preparadas que sejam armazenadas no seu invólucro inicial, entre 2 e 8 °C, até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculadas até ao fim do prazo de validade e incubadas durante os períodos de incubação recomendados (até 8 semanas para os meios de micobacteriologia). Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

Deterioração do produto

Não utilize placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Foram criados vários zaragatoas e recipientes para a colheita de amostras. As amostras devem ser obtidas antes de ser administrada terapêutica antimicrobiana. Devem tomar-se as providências necessárias para a entrega imediata no laboratório. Foram criados vários meios de conservação ou sistemas de transporte, tais como os produtos de colheita e transporte de amostras **BD BBL**, para prolongar a sobrevivência de microrganismos quando se esperar um atraso significativo entre a colheita e a repicagem definitiva.

Para obter pormenores sobre a colheita e preparação de amostras, consulte os textos apropriados.^{9,10}

IX PROCEDIMENTO

Material fornecido

BD BBL Seven H11 Agar (Deep Fill)

Material necessário mas não fornecido

Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Procedimento do teste

A superfície do ágar deve estar lisa e húmida, mas sem humidade excessiva.

Os procedimentos de teste são os recomendados pelos Centers for Disease Control (CDC) para o isolamento primário a partir de amostras que contenham micobactérias.¹¹ É recomendada uma solução de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) como agente de digestão e descontaminação suave, mas eficaz. Estes reagentes são fornecidos no **BD MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit (Kit de digestão/descontaminação de amostras de micobactérias **BD MycoPrep**). Para instruções pormenorizadas sobre a descontaminação e cultura, consulte uma referência bibliográfica apropriada.⁹⁻¹²

Após a incubação, mantenha as placas protegidas da luz e coloque-as, com o lado com meio voltado para baixo, dentro de um sistema **BD GasPak** EZ ou noutro sistema adequado de fornecimento de uma atmosfera aeróbia enriquecida com dióxido de carbono, e incube a 35 ± 2 °C.

NOTA: As culturas efectuadas a partir de lesões cutâneas em que há suspeita de terem *M. marinum* ou *M. ulcerans* devem ser incubadas entre 25 e 33 °C para incubação primária; as culturas em que há suspeita de *M. avium* ou *M. xenopi* exibem um crescimento óptimo entre 40 e 42 °C.¹¹ Incube uma cultura duplicada entre 35 e 37 °C.

Controlo de qualidade pelo utilizador

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas do CLSI e os regulamentos da CLIA que dizem respeito a este assunto, para obter orientações sobre práticas de controlo de qualidade apropriadas.

X RESULTADOS

As placas podem ser lidas no prazo de 5 a 7 dias após a inoculação e, depois deste período, uma vez por semana até um período máximo de 8 semanas.

Para examinar as placas, inverta-as sobre a plataforma de um microscópio de dissecação. Observe com uma ampliação de 10 a 60x, com luz transmitida. Observe rapidamente com a ampliação de 10 a 20x, verificando se existem colónias. Uma ampliação superior (30 a 60x) é útil para observação da morfologia das colónias, por exemplo, colónias sinuosas em forma de cordão.

Registe as seguintes observações:¹¹

1. Número de dias necessário para as colónias se tornarem macroscopicamente visíveis.
2. Número de colónias:
Sem colónias = Negativo
Inferior a 50 colónias = Contagem real
50 a 100 colónias = 1+
100 a 200 colónias = 2+
Praticamente confluentes (200 a 500) = 3+
Confluentes (mais de 500) = 4+
3. Produção de pigmento
Branco, creme ou amarelo-claro = Não cromogéneo (NC)
Amarelo-limão, amarelo, laranja, vermelho = Cromogéneo (Ch)

Os esfregaços corados podem apresentar bacilos com coloração ácida rápida, que são referidos apenas como “bacilos com coloração ácida rápida”, a não ser que sejam efectuados testes definitivos.¹¹

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Este meio destina-se ao isolamento primário. Contudo, é recomendada uma cultura pura para os testes bioquímicos e procedimentos serológicos. Consulte os textos apropriados para obter mais informações.⁹⁻¹³

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Num estudo realizado por Rastogi et al. no instituto Pasteur, os resultados do teste de sensibilidade a fármacos obtidos em Ágar 7H11 foram comparáveis com um método radiométrico, utilizando o sistema **BD BACTEC** 460TB. Além disso, a investigação justificou a escolha do Ágar 7H11 em relação ao Ágar Lowenstein-Jensen para testes de sensibilidade a fármacos convencionais.¹⁴

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat. Descrição

221870 **BD BBL** Seven H11 Agar (Deep Fill)

XIV BIBLIOGRAFIA

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. Sahn, 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. Tover, 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.

Assistência Técnica e Suporte: contacte o representante local da BD ou visite 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.