

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

I WPROWADZENIE

Lim Broth (Bulion Lim) stosuje się w celu selektywnego wzbogacenia populacji paciorkowców grupy B (*Streptococcus agalactiae*).

II PROCEDURA TESTU WYDAJNOŚCI

- Inokulować reprezentatywne próbki podłoża hodowlami wymienionych poniżej szczepów.
 - Stosując jałowe pipety o objętości 1,0 mL, należy wykonać posiew w probówkach używając 1,0 mL rozcieńczeń z trwającej 18 – 24 godziny hodowli **Trypticase** Soy Broth. Rozcieńczenie powinno zawierać 1000 lub mniej jednostek tworzących kolonie – CFU/mL dla *S. agalactiae* oraz $1,0 \times 10^5$ CFU/mL dla *E. coli*.
 - Inkubować próbki z poluzowanymi zatyczkami w temperaturze 35 ± 2 °C w atmosferze tlenowej.
- Po 3 dniach należy sprawdzić próbki pod kątem wzrostu kolonii.
- Oczekiwane wyniki

Mikroorganizmy	ATCC	Odzysk
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12386	Wzrost (umiarkowanego do intensywnego)
<i>Escherichia coli</i>	25922	Zahamowanie (częściowe do całkowitego)

*Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

UWAGA: To podłoże jest zwolnione z testów kontroli jakości użytkownika zgodnie ze standardem CLSI M22-A3.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

- Oceń próbki według opisu w części „Pogorszenie jakości produktu”.
- Wzrokowo oceń reprezentatywne próbki, żeby upewnić się, że w ich użytkowaniu nie będą przeszkadzały żadne wady fizyczne.
- Określić potencjometrycznie wartość pH w temperaturze pokojowej, aby upewnić się, że odczyn jest zgodny ze specyfikacją i wynosi $7,8 \pm 0,2$.
- Inkubować reprezentatywne próbki bez wysianych drobnoustrojów w temperaturze 20 – 25 °C i 30 – 35 °C oraz po 7 dniach ocenić pod względem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJA O PRODUKCIE

IV PRZEZNACZENIE

Lim Broth stosuje się w celu selektywnego wzbogacenia populacji paciorkowców grupy B (*Streptococcus agalactiae*), zwłaszcza z próbek pochodzących z narządów płciowych.

V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

Od odkrycia w latach 70. XX w. zakażenia noworodków wywołanego przez paciorkowce grupy B, choroba ta stała się główną zakaźną przyczyną chorobowości i zgonów noworodków. Przed 1994 r. szacowano, że każdego roku w Stanach Zjednoczonych stwierdza się 7600 przypadków inwazyjnej choroby paciorkowcowej wywołanej przez paciorkowce grupy B u noworodków. Przede wszystkim są to przypadki posocznicy i zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. W ok. 80% tych przypadków choroba ma wczesny początek i występuje w ciągu pierwszego tygodnia życia.¹ Choroba jest przenoszona przez zakażenie wertykalne z matki na noworodka. U matki paciorkowce grupy B są zlokalizowane w okolicy odbytniczej lub okolicy narządów płciowych. Lim i współpracownicy połączyli stosowanie wzbogaconego, selektywnego podłoża bulionowego ze szkiełkowym testem aglutynacji w celu szybkiej diagnostyki takich matek.²⁻⁵

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) zaproponowały wytyczne dotyczące badań przesiewowych oraz stosowania śródporodowej chemioprophylaktyki w celu zapobiegania noworodkowej chorobie paciorkowcowej wywołanej przez paciorkowce z grupy B.⁶ Zaleca się stosowanie Todd Hewitt Broth z kolistyną i kwasem nalidyksowym jako podłoża zwiększającego prawdopodobieństwo wykrycia wzrostu paciorkowców grupy B na płytkach z agarem z krwią owczą.¹ Lim Broth jest przygotowany z bulionu Todd Hewitt Broth, do którego dodaje się zalecane stężenia kolistyny i kwasu nalidyksowego oraz wyciągu z drożdży w celu poprawy wzrostu paciorkowców z grupy B.²

Paciorkowce grupy B wyizolowano także w przypadkach posocznicy u kobiet, które nie rodziły, oraz u mężczyzn, a także w przypadkach zakażeń stawów, zapaleń szpiku kostnego, zakażeń układu moczowego oraz zakażeń ran. Bakterie te wywołują zapalenie wsierdza, zapalenie płuc oraz zakażenia skóry i tkanek miękkich u chorych z upośledzoną czynnością układu odpornościowego.⁷

VI ZASADY PROCEDURY

Todd Hewitt Broth jest uniwersalnym podłożem stosowanym przede wszystkim do hodowli beta-hemolizujących paciorkowców, zwłaszcza w badaniach serologicznych.⁸

Peptony, dekstroza i sole zapewniają doskonałą podstawę żywieniową do wzrostu paciorkowców. Dodany wyciąg z drożdży jest bogatym źródłem witamin z grupy B. Dekstroza pobudza wytwarzanie hemolizyny. Fosforan dwusodowy i węglan sodu zapewniają działanie buforujące, przeciwdziałając zakwaszaniu środowiska, do którego dochodzi podczas fermentacji węglowodanów. W ten sposób chronią hemolizynę przed inaktywacją powodowaną przez kwas. Kwas nalidyksowy i kolistyna hamują wzrost bakterii Gram-ujemnych.

VII ODCZYNNIKI

Lim Broth

Przybliżony skład* w przeliczeniu na litr wody oczyszczonej

Wyciąg sercowy (stały)	3,1	g
Peptony	20,0	g
Dekstroza	2,0	g
Chlorek sodu	2,0	g
Fosforan dwusodowy	0,4	g
Węglan sodu	2,5	g
Wyciąg z drożdży	10,0	g
Kolistyna	0,01	g
Kwas nalidyksowy	0,015	g

*Skorygowany lub uzupełniony zgodnie z wymaganiami, których celem jest spełnienie kryteriów wydajności.

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

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

W próbkach klinicznych mogą być obecne drobnoustroje patogenne, takie jak wirusy zapalenia wątroby i HIV. Podczas pracy z wszelkimi materiałami zanieczyszczonymi krwią i innymi płynami ustrojowymi należy stosować „Standardowe środki ostrożności”⁹⁻¹² oraz przestrzegać wytycznych obowiązujących w danym laboratorium. Po użyciu gotowe probówki, pojemniki zawierające próbki oraz inne skażone materiały należy przed usunięciem wysterylizować w autoklawie.

Przechowywanie: Po otrzymaniu przechowywać probówki w ciemności w temperaturze 2 – 8 °C. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Otwierać bezpośrednio przed użyciem. Ograniczać do minimum ekspozycję na światło. W podłożach, które do momentu użycia przechowuje się w probówkach, zgodnie z instrukcjami podanymi na etykiecie, można wykonywać posiewy do dnia określonego terminem ważności, a następnie prowadzić inkubację przez zalecany czas. Przed posiewem ogrzać podłoże do temperatury pokojowej.

Pogorszenie jakości produktu: Nie używać podłoża w przypadku widocznych oznak skażenia mikrobiologicznego, zmian zabarwienia, wysychania lub innych objawów świadczących 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.^{7,13} Próbkę należy uzyskać przed zastosowaniem środków przeciwbakteryjnych. Próbkę powinny zostać niezwłocznie dostarczone do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczane materiały: Lim Broth

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

Procedura testowa: Stosować techniki aseptyczne.

Należy wykonać posiew w probówkach i inkubować je z poluzowanymi zakrętkami w temperaturze 35 ± 2°C, w warunkach tlenowych, z dodatkiem dwutlenku węgla lub bez. W razie potrzeby po 5 godzinach inkubacji przeprowadzić test aglutynacji szkiełkowej dla paciorkowców grupy B.⁴

Jeśli po 18-24 godzinach doszło do zmętnienia, z hodowli na pożywce bulionowej należy założyć osobną hodowlę na płycie pokrytej agarą wzbogaconą krwią owczą. W przeciwnym wypadku posiew trzeba inkubować przez dodatkowe 24 godziny przed zniszczeniem.¹

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 i przepisów CLIA dotyczących metod kontroli jakości.

Aby określić pH podłoża próbki metodą potencjometryczną, należy wykorzystać pojedynczą elektrodę o odpowiednio niewielkich rozmiarach dopasowanych do probówek. Końcówkę elektrody należy umieścić poniżej powierzchni pożywki bulionowej.

X WYNIKI

W pożywce bulionowej wzrost jest widoczny jako zmętnienie w porównaniu z kontrolą nieinokulowaną.

Należy założyć osobną hodowlę na płytkach z agarowym podłożem z soją **Trypticase** Soy Agar, wzbogaconą 5% krwią owczą (TSA II) oraz inkubować próbki przez 18 – 24 godziny, a w razie konieczności do 48 godzin. Należy zidentyfikować drobnoustroje przypominające paciorkowce grupy B (beta- lub niehemolizujące, ziarniaki Gram-dodatnie i katalazo-ujemne). Można wykonać swoistą identyfikację; np. stosując surowice do oznaczania grup paciorkowców, test CAMP lub inne metody.

Jones i wsp. donosili o wykrywaniu paciorkowców grupy B za pomocą metody aglutynacji szkiełkowej po 5 godzinach inkubacji, gdy stężenie mikroorganizmów w hodowli wynosiło 10⁷ na mL lub więcej.⁴

XI OGRANICZENIA PROCEDURY

Do identyfikacji niezbędne są czyste kultury drobnoustrojów. W celu ostatecznej identyfikacji należy przeprowadzić badania morfologiczne, biochemiczne lub serologiczne. W celu uzyskania szczegółowych informacji oraz wiadomości na temat zalecanych procedur należy zapoznać się z odpowiednimi pozycjami piśmiennictwa.^{7,13,14}

XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Nguyen i wsp. stosowali bulion Lim w połączeniu z agarem sojowym **Trypticase** Soy Agar z dodatkiem 5% krwi owczej (TSA) jako złoty standard w wykrywaniu paciorkowców grupy B w próbkach uzyskanych z dolnych dróg rodnych ciężarnych kobiet. Z 524 kobiet u 90 uzyskano dodatnie hodowle w podłożach Lim Broth lub TSA. Czułość, swoistość, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna bulionu Lim wynosiły odpowiednio 97% (87/90), 100% (434/434), 100% (87/87) oraz 97% (434/437).¹⁵

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Nr kat.	Opis
292209	BD BBL Lim Broth, 5 mL, opakowanie zawierające 10 probówek o rozmiarze K
296266	BD BBL Lim Broth, 5 mL, pudełko zawierające 100 probówek o rozmiarze K

XIV PIŚMIENNICTWO

1. Federal Register. 1994. Prevention of group B streptococcal disease: a public health perspective. Fed. Regist. 59:64764-64773.
2. Jones, D.E., E.M. Friedl, K.S. Kanarek, J.K. Williams, and D.V. Lim. 1983. Rapid identification of pregnant women heavily colonized with group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 18:558-560.
3. Lim, D.V., K.S. Kanarek, and M.E. Peterson. 1982. Magnitude of colonization and sepsis by group B streptococci in newborn infants. Curr. Microbiol. 7:99-101.
4. Jones, D.E., K.S. Kanarek, and D.V. Lim. 1984. Group B streptococcal colonization patterns in mothers and their infants. J. Clin. Microbiol. 20:438-440.
5. Jones, D.E., K.S. Kanarek, J.L. Angel, and D.V. Lim. 1983. Elimination of multiple reactions of the Phadebact *Streptococcus* coagglutination test. J. Clin. Microbiol. 18:526-528.
6. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Morbid. Mort. Weekly Rep. 51 (No. RR-11):1.
7. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
8. Todd, E.W., and L.F. Hewitt. 1932. A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. J. Pathol. Bacteriol. 35:973-974.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Nguyen, T.M. et al. 1998. Detection of group B *Streptococcus*: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. J. Matern. Fetal. Med. Jul-Aug; 7(4):172-176.

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 and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD.