

PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

I WPROWADZENIE

Podłoże SIM (siarkowódór, indol, ruchliwość, ang. Sulfide Indole Motility) stosuje się do wykrywania produkcji siarkowodoru i indolu oraz ruchliwości u drobnoustrojów jelitowych.

II PROCEDURA TESTU WYDAJNOŚCI

- Wykonać posiew reprezentacyjnej próby podłoża hodowlami wymienionych poniżej szczepów.
 - Poluzować nakrętki, ogrzać próbówki we wrzącej łaźni wodnej i schłodzić przed użyciem.
 - Używając rozcieńczeń 10^{-1} 18 – 24-godzinnych hodowli szczepów prowadzonych na podłożu **Trypticase** Soy Broth (bulion sojowy **Trypticase**), wykonać posiewy w próbkach poprzez wbicie w środek podłoża prostej igły w przybliżeniu do połowy jego głębokości.
 - Inkubować próbówki z poluzowanymi nakrętkami w temperaturze $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ w warunkach tlenowych.
- Zbadać próbówki po upływie 18 – 24 oraz 42 – 48 godzin pod kątem wzrostu, ruchliwości i produkcji siarkowodoru.
- Po 48 godzinach wykonać test na produkcję indolu. Dodać 0,2 mL odczynnika Kovacs'a do wnętrza próbek. Obserwować, czy następuje zabarwienie na różowo lub czerwono (reakcja dodatnia).
- Oczekiwane wyniki

Drobnoustroje	ATCC	H ₂ S	Indol	Ruchliwość
* <i>Escherichia coli</i>	25922	–	+	+
* <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotyp Typhimurium	13311	+	–	+
* <i>Shigella sonnei</i>	9290	–	–	–

*Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

- Oceń próbówki według opisu w części „Pogorszenie jakości produktu”.
- Wzrokowo ocenić reprezentatywne próbówki, aby upewnić się, że w ich użytkowaniu nie będą przeszkadzały żadne wady fizyczne.
- Reprezentatywne próbówki bez wysianych drobnoustrojów inkubować w temperaturze 20 – 25°C oraz 30 – 35°C i po 7 dniach ocenić pod kątem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJA O PRODUKCIE

IV PRZEZNACZENIE

Podłoże SIM stosuje się do różnicowania pałeczek jelitowych na podstawie produkcji siarkowodoru i indolu oraz ruchliwości.

V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

Produkcja siarkowodoru i indolu oraz ruchliwość są cechami różnicującymi, które ułatwiają identyfikację bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, zwłaszcza rodzajów *Salmonella* i *Shigella*. Podłoże SIM jest w związku z tym przydatne w identyfikacji patogenów jelitowych.

VI ZASADY PROCEDURY

Składniki podłoża SIM umożliwiają ocenę trzech rodzajów aktywności, na podstawie których różnicuje się bakterie jelitowe. Tiosiarczan sodu oraz siarczan żelazowo-amonowy są wskaźnikami produkcji siarkowodoru. Siarczan żelazowo-amonowy reaguje z gazowym H₂S, w wyniku czego powstaje czarny osad siarczku żelaza.¹ Pepton kazeinowy jest bogaty w tryptofan, który jest przetwarzany przez niektóre drobnoustroje, w wyniku czego powstaje indol. Indol wykrywa się, dodając odczynnik chemiczny po zakończeniu okresu inkubacji. Wykrycie ruchliwości jest możliwe dzięki półstałej konsystencji podłoża. Promieniowy wzrost ze środkowej linii wbicia igły wskazuje na ruchliwość testowanego drobnoustroju.

VII ODCZYNNIKI

Podłoże SIM

Przybliżony skład* w przeliczeniu na litr wody oczyszczonej

Trzustkowy wyciąg kazeiny	20,0 g
Pepsynowy wyciąg tkanki zwierzęcej	6,1 g
Siarczan żelazowo-amonowy	0,2 g
Tiosiarczan sodu	0,2 g
Agar	3,5 g

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

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

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

Wykonywanie wszystkich procedur wymaga przestrzegania technik aseptycznych i środków ostrożności związanych z zagrożeniem mikrobiologicznym. Po użyciu gotowe próbówki, pojemniki zawierające próbki oraz inne skażone materiały należy przed usunięciem wysterylizować w autoklawie.

Przechowywanie: Po otrzymaniu przechowywać próbówki w ciemności w temperaturze 2–25°C. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Otwierać bezpośrednio przed użyciem. Ograniczać do minimum ekspozycję na światło. W podłożach, które do momentu użycia przechowywane są w próbkach, 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 drobnoustrojami, 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.^{2,3} Probki należy uzyskać przed zastosowaniem środków przeciwbakteryjnych. Probki powinny zostać niezwłocznie dostarczone do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczane materiały: Podłoże SIM

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

Procedura testowa: Stosować techniki aseptyczne.

Poluzować nakrętki, ogrzać próbówki we wrzącej łaźni wodnej i schłodzić przed użyciem. Używając rozcieńczonego inokulum czystej hodowli, przebić podłoże igłą do posiewów do połowy odległości od dna podłoża, pośrodku próbówki. Inkubować próbówki z poluzowanymi nakrętkami przez 18 – 48 godzin w temperaturze 35°C ± 2°C, w warunkach tlenowych.

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

Należy postępować zgodnie z obowiązującymi wymogami kontroli jakości, wynikającymi z przepisów miejscowych, krajowych i/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 metod kontroli jakości.

X WYNIKI

Po inkubacji zbadać próbówki pod kątem wzrostu (rozproszony wzrost w kierunku zewnętrznym od linii wbicia igły lub zmętnienie całego podłoża) oraz produkcji H₂S (zaczernienie wzdłuż linii wbicia igły). W celu wykrycia produkcji indolu dodać trzy lub cztery krople odczynnika Kovacsa² i obserwować, czy następuje zabarwienie na czerwono (reakcja dodatnia).

Dane dotyczące aktywności poszczególnych drobnoustrojów można znaleźć w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.⁴⁻⁶

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 wiadomości na temat zalecanych procedur należy zapoznać się z odpowiednimi pozycjami piśmiennictwa.²⁻⁶

XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Przed dopuszczeniem do obrotu wszystkie partie podłoża SIM sprawdza się pod względem ich wydajności. Reprezentatywna próba podłoża z danej partii testowana jest z użyciem prowadzonych na podłożu **Trypticase** Soy Broth (bulion sojowy **Trypticase**) rozcieńczonych (10⁻¹) hodowli szczepów *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Shigella sonnei* (ATCC 9290); zaszczepia się je poprzez wbicie igły do posiewów w środek podłoża, w przybliżeniu do połowy jego głębokości. Probówki z poluzowanymi nakrętkami inkubuje się w temperaturze 35°C ± 2°C, a po upływie 18 – 24 oraz 42–48 godzin dokonuje odczytu wzrostu oraz produkcji indolu i siarkowodoru. Wzrost wszystkich drobnoustrojów w ciągu 48 godzin jest umiarkowany do znacznego. Szczepy *E. coli* i *Salmonella* Typhimurium są ruchliwe, na co wskazuje wzorec wzrostu drobnoustrojów w podłożu, tj. bierze on początek od środkowej linii posiewu i rozprzestrzenia się równomiernie przez podłoże. Szczep *S. sonnei* nie wykazuje ruchliwości, tzn. wzrost jest widoczny jedynie wzdłuż środkowej linii posiewu. Jedynie *Salmonella* Typhimurium daje dodatni wynik testu na produkcję siarkowodoru, co uwidacznia się zaczernieniem podłoża. Po 48-godzinnej inkubacji do każdej próbówki dodaje się 0,2 mL odczynnika Kovacsa. Tylko *E. coli* daje dodatni wynik testu na produkcję indolu, na co wskazuje wystąpienie w próbówce reakcji barwnej dającej zabarwienie od różowego do ciemnoróżowego.

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Nr kat.	Opis
221010	BD BBL SIM Medium, opakowanie 10 próbek o rozmiarze K
221011	BD BBL SIM Medium, karton 100 próbek o rozmiarze K

XIV PIŚMIENNICTWO

1. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
2. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller (ed.) 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
4. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
5. 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.
6. Farmer, J.J., III. 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442-458. 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.

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.