



PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI

I WPROWADZENIE

Todd Hewitt Broth with Gentamicin and Nalidixic Acid (z gentamycyną i kwasem nalidyksowym) stosuje się w celu selektywnego wzbogacenia populacji paciorkowców grupy B (*Streptococcus agalactiae*).

II PROCEDURA TESTU

1. Podłoża zaszczenia się reprezentatywnymi próbkami wymienionych szczepów.
 - a. Stosując jałowe pipety o objętości 1 mL należy wykonać posiew w probówkach używając 1 mL rozcieńczenia z trwającej 18 – 24 godz. hodowli **Trypticase** Soy Broth. Stosowane rozcieńczenie powinno zawierać 1 000 lub mniej CFU (jednostek tworzących kolonie)/mL *S. agalactiae* oraz $1,0 \times 10^5$ CFU/mL *E. coli*.
 - b. Inkubować próbki z poluzowanymi zatyczkami w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$ w atmosferze tlenowej.
2. Po maksymalnie 3 dniach należy sprawdzić próbki pod kątem wzrostu kolonii.
3. Oczekiwane wyniki
**Streptococcus agalactiae*..... Wzrost
12386
**Escherichia coli* Brak wzrostu
25922
*Zalecane szczepy drobnoustrojów do przeprowadzenia kontroli jakości dokonywanej przez użytkownika.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

1. Ocenic próbki według opisu w części „Pogorszenie jakości produktu”.
2. Wzrokowo ocenic reprezentatywne próbki, aby upewnić się, że żadne wady fizyczne nie będą przeszkadzały w ich użytkowaniu.
3. Określić potencjometrycznie wartość pH w temperaturze pokojowej, aby upewnić się, że odczyn jest zgodny ze specyfikacją i wynosi $7,8 \pm 0,3$.
4. Inkubować reprezentatywne próbki bez wysianych drobnoustrojów w temperaturze $20 - 25^\circ\text{C}$ oraz $30 - 35^\circ\text{C}$; ocenic po 7 dniach sprawdzić pod względem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJE O PRODUKCIE

IV PRZEZNACZENIE

Todd Hewitt Broth z gentamycyną i kwasem nalidyksowym stosuje się w celu selektywnego wzbogacenia populacji paciorkowców grupy B (*Streptococcus agalactiae*), zwłaszcza pochodzących z materiałów z okolic narządów płciowych.

V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

Od odkrycia w latach siedemdziesiątych XX wieku zakażenia noworodków wywołanego przez paciorkowce grupy B choroba ta stała się główną, zakaźną przyczyną chorobowości i zgonów wśród noworodków. Przed rokiem 1994 szacowano, że każdego roku w Stanach Zjednoczonych u noworodków występuje 7 600 przypadków inwazyjnej choroby paciorkowcowej wywołanej przez paciorkowce grupy B, przede wszystkim przypadki posocznicy i zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Około 80% wymienionych przypadków to choroba o wczesnym początku, występująca w ciągu pierwszego tygodnia życia.¹ Choroba jest przenoszona na noworodki poprzez zakażenie wertykalne od matki, która jest nosicielką paciorkowców grupy B w okolicy odbytniczej lub okolicy narządów płciowych.

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.² Zaleca się stosowanie Todd Hewitt Broth z gentamycyną i kwasem nalidyksowym (lub Lim Broth), aby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia wzrostu paciorkowców grupy B na płytkach z agarowym podłożem wzbogaconym krwią owczą.^{2,3}

Paciorkowce grupy B wyizolowano także w przypadkach posocznicy u kobiet, które nie rodziły, oraz u mężczyzn, a także zakażeń stawów, zapaleń szpiku kostnego, zakażeń układu moczowego oraz zakażeń ran. Wymienione bakterie wiążą się z występowaniem zapalenia wsierdza, zapalenia płuc oraz zakażeń skóry i tkanek miękkich u chorych z upośledzoną czynnością układu odpornościowego.⁴

VI ZASADY PROCEDURY

Todd Hewitt Broth jest uniwersalnym podłożem stosowanym przede wszystkim do hodowli beta-hemolizujących paciorkowców, zwłaszcza w badaniach serologicznych.^{5,6} Podłoże cechuje się dużymi wartościami odżywczymi ze względu na zawartość peptonów, dekstrozy i soli. Dekstroza pobudza wytwarzanie hemolizyny. Fosforan sodu i węglan sodu zapewniają działanie buforujące, przeciwdziałając zakwaszaniu środowiska, które ma miejsce podczas fermentacji dekstrozy. W ten sposób chronią hemolizynę przed inaktywacją powodowaną przez kwas.⁷

Selektywność w odniesieniu do paciorkowców grupy B osiąga się poprzez dodanie do podłoża gentamycyny i kwasu nalidyksowego. Selektywnie wzbogacająca pożywka bulionowa cechuje się zaletami zarówno wzbogacania, jak i selekcji poprzez zapewnienie warunków sprzyjających wzrostowi paciorkowców grupy B, a hamowanie wzrostu czynników zanieczyszczających próbki.

VII ODCZYNNIKI

Todd Hewitt Broth z gentamycyną i kwasem nalidyksowym

Przybliżony skład* w przeliczeniu na litr wody oczyszczonej

Wyciąg sercowy (stały).....	3.1 g	Fosforan sodu.....	0.4 g
Peptony.....	20.0 g	Węglan sodu.....	2.5 g
Dekstroza.....	2.0 g	Gentamycyna.....	8.0 mg
Chlorek sodu.....	2.0 g	Kwas nalidyksowy.....	15.0 mg

*Dostosowany i (lub) uzupełniony zgodnie z wymaganiami w celu spełnienia kryteriów wydajności.

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

Probówki z mocno dopasowanymi zakrętkami należy otwierać ostrożnie, aby uniknąć urazu związanego z rozbiciem szkła.

W próbkach klinicznych mogą być obecne drobnoustroje patogenne, w tym wirusy zapalenia wątroby oraz ludzki wirus upośledzenia odporności. Podczas postępowania ze wszystkimi przedmiotami skażonymi krwią i innymi płynami ustrojowymi należy przestrzegać „Standardowych środków ostrożności”⁸⁻¹¹ oraz wytycznych stosowanych w danej instytucji. Gotowe probówki, pojemniki zawierające próbki oraz inne skażone materiały po użyciu i przed usunięciem należy wysterylizować w autoklawie.

Wskazówki dotyczące przechowywania: Po odbiorze probówki należy przechowywać w ciemnym miejscu, w temperaturze 2 – 8°C. Unikać zamrażania i przegrzewania. Nie otwierać do chwili użycia. Do minimum ograniczać kontakt ze światłem. W pożywkach 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. Przed posiewem ogrzać podłoże do temperatury pokojowej.

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

VIII POBIERANIE PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z NIMI

Podczas postępowania z próbkami materiału odpowiednimi do hodowli można stosować różne techniki.

Szczegółowe informacje znajdują się w odpowiednich pozycjach piśmiennictwa.^{4,12} Probki należy uzyskiwać przed zastosowaniem środków przeciwbakteryjnych. Probki powinny zostać niezwłocznie dostarczone do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczone materiały: Todd Hewitt Broth z gentamycyną i kwasem nalidyksowym

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

Procedura testowa: Stosować techniki aseptyczne

Należy wykonać posiew w probówkach i inkubować je z poluzowanymi zakrętkami w temperaturze 35 ± 2°C przez 18 – 24 godz. w warunkach tlenowych z dodatkiem lub bez dodatku dwutlenku węgla.

Jeśli doszło do zmętnienia, z hodowli na pożywkę bulionową należy założyć osobną hodowlę na płycie pokrytej agarem wzbogaconym krwią owczą; w przeciwnym wypadku posiew należy inkubować przez dodatkowe 24 godziny przed zniszczeniem.^{3,4,13}

Kontrola jakości przez użytkownika: Zob. „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) oraz przepisów CLIA dotyczących sposobów 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

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

XI OGRANICZENIA PROCEDURY

Do identyfikacji niezbędne są czyste kultury drobnoustrojów. W celu ostatecznej identyfikacji należy wykonać badania morfologiczne, biochemiczne i/lub serologiczne. Szczegółowe informacje i opisy zalecanych procedur można znaleźć w stosownym piśmiennictwie.^{4,12,14}

XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Przed dopuszczeniem na rynek wszystkie serie podłoży Todd Hewitt Broth z gentamycyną i kwasem nalidyksowym są sprawdzane pod względem charakterystyki wydajnościowej. Wykonuje się posiew na reprezentatywnych próbkach serii za pomocą 1 mL roztworu *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386), rozcieńczonego tak, aby zawierał 1 000 lub mniej jednostek tworzących kolonie (CFU) na ml oraz 1 mL roztworu *Escherichia coli* (ATCC 25922), rozcieńczonego tak, aby zawierał 10⁵ CFU/mL. Probówki z poluzowanym zakrętkami inkubuje się w temperaturze 35 ± 2°C. *S. agalactiae* wykazuje umiarkowany do nasilonego wzrost w ciągu 3 dni, podczas gdy wzrost *E. coli* zostaje zahamowany po 3 dniach inkubacji.

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Kat. Nr	Opis
299486	BBL Todd Hewitt Broth z gentamycyną i kwasem nalidyksowym, zawiera 100 probówek w rozmiarze K

XIV PIŚMIENNICTWO

1. Federal Register. 1994. Prevention of group B streptococcal disease: a public health perspective. Fed. Regist. 59:64764-64773.
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 51 (No. RR-11):1.
3. Ruoff, K.L., R.A. Whaley, and D. Beighton. 2003. *Streptococcus*, p. 405-421. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
5. 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.
6. Updyke, E.L., and M.I. Nickle. 1954. A dehydrated medium for the preparation of type specific extracts of group A streptococci. Appl. Microbiol. 2:117-118.
7. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.) 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Isenberg, H. (ed.). 2004. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1, 2 and 3, 2nd 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.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2011 BD