

I BEVEZETŐ

A Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (glicerines tápleves) nem szelektív tápközeg a mycobacteriumok tenyésztésére.

II A TELJESÍTMÉNY ELLENŐRZÉSE**A. Eljárás az inokulátum előkészítésére**

1. Steril inokuláló pálcikák használatával oltson be Lowenstein-Jensen ferde síkú táptalajokat a megfelelő mycobacterium törzsek törzstenyésztével.
2. Széndioxiddal (5–10%) dúsított aerob légterben $35 \pm 2^\circ\text{C}$ -on inkubálja a fellazított dugójú kémcsöveket, míg sűrű telepeket nem kap (általában 2–3 héten belül).
3. Egy steril, kiélezett kenőlap segítségével, a sejteknek a táptalaj felszínéről való óvatos leválasztásával gyűjtse be a telepeket, ügyelve arra, hogy a begyűjtött sejtek ne tartalmazzanak táptalajt.
 - a. *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 esetében:
 - (1) Vigye át a telepet egy steril, csavaros kupakkal ellátott, steril üveggyöngyöket tartalmazó, üveg kémcsőben levő 5,0 mL Middlebrook 7H9 glicerines táplevesbe.
 - (2) Alaposan kevertesse meg (több percig), míg a szuszpenzióban már nincsenek nagy darabok.
 - (3) Hasonlítsa össze ezt a szuszpenziót egy McFarland #1 zavarosságmérő standarddal. A szuszpenzióknak a standardnál zavarosabbnak kell lennie.
 - (4) Helyezze a kémcsövet szobahőmérsékleten 2–3 órára egy állványba, hogy a nagyobb méretű részecskék leülepedhessenek.
 - (5) A felülúszót vigye át egy steril tárolóedénybe.
 - (6) Steril Middlebrook 7H9 glicerines tápleves lassú hozzáadásával állítsa be a szuszpenzió zavarosságát a McFarland #1 standardhoz (10^8 CFU/mL). Az oldatot alaposan rázza össze.
 - (7) Használat előtt hígítsa fel 10^5 CFU/mL-re. Alaposan keverje össze, és egy 0,01 mL-es kalibrált kacs segítségével inokulálja a tesztelési táptalajt.

b. Minden más mycobacteriumtörzs esetében:

- (1) Vigye át a telepet egy steril, csavaros kupakkal ellátott, 50 mL-es, 8–12 steril (2 mm átmérőjű) üveggyöngyöt, valamint 5 mL, az alábbiak szerint elkészített mycobacterium-hígítószeret tartalmazó centrifugacsőbe:
 - Egy 1 L-es lombikban keverje össze a következő anyagokat, és 1N nátrium-hidroxiddal állítsa a pH-t 6,7–7,0 közötti értékre:
Szarvasmarha-albumin (zsírsavmentes) 1,0 g
Poliszorbát 80 0,1 mL
Desztillált víz 500 mL
 - Membránszűrővel sterilizálja (0,2 μ -os szűrő)
 - Aseptikusan ossza szét csavaros zárókupakkal ellátott, steril, 5,5 mL-es centrifugacsövekbe.
- (2) Egy kenőlap alkalmazásával, egy csavaros tetővel ellátott centrifugacső oldalfalán emulgeálja a mycobacterium-telepet. Keverje össze a telepet a hígítószerrel.
- (3) Zárja le a kémcsövet, és kb. 10 percig „kevertesse”, hogy a telep megfelelően szuszpendálódjon, és ne tartalmazzon nagy darabokat.
- (4) Adjon hozzá 15 mL steril mycobacterium-hígítószeret, és alaposan keverje össze.

- (5) Hasonlítsa össze ezt a szuszpenziót egy McFarland #1 zavarosságmérő standarddal. A szuszpenzióknak a standardnál zavarosabbnak kell lennie.
- (6) Helyezze a kémcsövet szobahőmérsékleten 2–3 órára egy állványba, hogy a nagyobb méretű részecskék leülepedhessenek.
- (7) Szívassa le a felülúszót, és vigye át egy steril tárolóedénybe. A szuszpenzióknak zavarosabbnak kell lennie, mint egy McFarland #1 standard, és nem tartalmazhat nagyméretű darabokat. Amennyiben még mindig vannak nagyméretű darabok, keverje össze, és hagyja állni további 1 órán keresztül. A felülúszót vigye át egy steril tárolóedénybe.
- (8) Steril mycobacterium-hígítószer lassú hozzáadásával állítsa be a szuszpenzió zavarosságát a McFarland #1 standardhoz (10^8 CFU/mL). Az oldatot alaposan rázza össze.
- (9) A szuszpenzióból mintákat osszon szét az organizmus azonosítását és a preparátum készítésének dátumát tartalmazó címkével ellátott fagyasztó fiolákba.
- (10) A fiolákat mélyhűtőbe helyezve -60°C -on fagyassza le a szuszpenziókat. A fiolák maximum 6 hónapig tárolhatók.
- (11) Használat előtt vegye ki a fagyott fiolát a fagyasztóból, és annak tartalmát $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe helyezve gyorsan olvassza ki. Használat előtt hígítsa fel 10^5 CFU/mL-re. Alaposan keverje össze, és egy 0,01 mL-es kalibrált kacs segítségével inokulálja a tesztelési táptalajt.

B. Eljárás a tápközeg tesztelésére

1. Oltson be reprezentatív mintákat a lent felsorolt törzsekkel.
 - a. Steril, egyszer használatos 0,01 mL-es kalibrált kacsok segítségével inokulálja a csöveket a fent leírt módon elkészített tenyészetekkel.
 - b. Inkubálja az inokulált, meglazított zárókupakú kémcsöveket $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ -on, széndioxiddal dúsított, aerob légterben.
2. 7, 14, illetve ha szükséges, 21 nap után vizsgálja meg a kémcsövekben a növekedést és a pigmentációt.
3. Várt eredmények

CLSI organizmusok	ATCC	Kimutatás
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Szaporodás
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , I. csoport	12478	Szaporodás
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , II. csoport	19981	Szaporodás
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , III. csoport	13950	Szaporodás
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , IV. csoport	6841	Szaporodás

*A felhasználói minőség-ellenőrzéshez ajánlott törzs.

III KIEGÉSZÍTŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

1. Ellenőrizze a csöveket a „Termék szavatossága” fejezetben leírtak szerint.
2. Szemrevételezze a csöveket, hogy talál-e rajtuk olyan fizikai sérülést, amely összeférhetetlen a használattal.
3. Inkubáljon reprezentatív, nem inokulált csöveket $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ -on és $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$ -on, és 7 nap után ellenőrizze az esetleges mikrobiológiai szennyeződéseket.

HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

IV HASZNÁLATI JAVASLAT

A Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol kiegészített tápközeg, amely lehetővé teszi a mycobacteriumok, így az *M. tuberculosis* tenyésztését is. Első sorban mycobacteriumok tiszta tenyészetének tenyésztésére szolgál laboratóriumi vizsgálatokhoz.

V ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MAGYARÁZAT

Middlebrook és munkatársai a 7H9 tápleves receptúráját ugyanabban az időben fejlesztették ki, amikor elkészítették a 7H10 agar alapot.¹⁻³ Mindkét tápközeg lehetővé teszi a mycobacterium fajok növekedését, ha kiegészítik tápanyagokkal, így glicerinnel, olajsavval, albuminnal és dextrózzal; kivételt képez az *M. bovis*, amelyet a glicerinnel gátol.

Ez a táptalaj használatos antimikrobiális vizsgálatokhoz inokulumok készítéséhez, alaptápközegeként biokémiai tesztekhez, valamint a törzstenyészetek továbbtenyésztéséhez.

VI AZ ELJÁRÁS MŰKÖDÉSI ELVE

A tápközegekben található számos szervesen oldható só a mycobacteriumok növekedéséhez nélkülözhetetlen anyagokat szolgáltatja. A nátrium-citrát citromsavvá alakul, és arra szolgál, hogy bizonyos szervesen oldható kationokat oldatban tartson. A nátrium-klorid, a szarvasmarha-albumin, a dextróz és a kataláz a Middlebrook ADC dúsító tápközegek része. Az albuminnak védő szerepe van, megköti a szabad zsírsavakat, amelyek toxikusak lehetnek a *Mycobacterium* fajokra nézve. A kataláz lebontja a tápközegekben esetlegesen található toxikus peroxidázokat. A dextróz energiaforrássul szolgál. A nátrium-klorid a szükséges elektrolitokat biztosítja. A tápközegek glicerinnel történő kiegészítése serkenti a mycobacteriumok növekedését.

VII REAGANSEK

Middlebrook 7H9 Broth

Hozzávetőlegesen 1 liter szűrt vízre vonatkoztatva*

Monokálium-foszfát	2,0	g	Vas-ammónium-citrát	0,04	g
Dinátrium-foszfát (Na ₂ HPO ₄)	1,5	g	Magnézium-szulfát	0,05	g
Mononátrium-glutamát	0,5	g	Cink-szulfát	0,001	g
Nátrium-citrát	0,1	g	Réz-szulfát	0,001	g
Ammónium-szulfát	0,5	g	Biotin	0,5	mg
Pyridoxin	0,001	g	Kalcium-klorid	0,5	mg

*Úgy beállítva és/vagy összekeverve, hogy megfeleljen a működési követelményeknek.

A teljes tápközegek az előkészített kémcsövekben a fent felsorolt összetevőkön kívül tartalmaz még literenként 2 mL glicerint és az ADC dúsító tápleves összetevőit, amelyek a következők:

Nátrium-klorid	0,85	g
Szarvasmarha-albumin (V. frakció)	5,0	g
Dextróz	2,0	g
Kataláz	4,0	mg
Nátrium-piruvát	1,0	g

Figyelmeztetés: *In vitro* diagnosztizáláshoz.

A nagyon szorosan záródó kupakú csöveket óvatosan kell felnyitni, nehogy eltörjön az üveg.

A klinikai minták aeroszolt nem képző manipulációinál, pl. saválló kenetek elkészítésénél Level 2 (2-es szintű) biológiai biztonságtechnikai módszerek és eljárások, valamint zárt berendezések és létesítmények szükségesek. Minden aeroszolképződéssel járó műveletet 1. vagy 2. osztályú biztonsági elszívófülke alatt kell elvégezni. Biosafety Level 3 szintű gyakorlat, elszigetelt felszerelés és berendezés szükséges az *M. tuberculosis* és az *M. bovis* tenyészetekkel való munkához. Az állatokkal végzett vizsgálatokhoz is speciális eljárás szükséges.⁴

Dolgozzon aseptikusan, és az összes munkafolyamat során legyen elővigyázatos a mikrobiológiai veszélyek elkerülése végett. Használat után autoklávban kell sterilizálni a felhasznált kémcsöveket, tartályokat és minden egyéb szennyezett anyagot még a kidobás előtt.

Tárolási útmutató: Átvétel után a csöveket 2–8°C-on, sötétben kell tárolni. Óvja a csöveket a megfagyástól és a túlmelegedéstől. Csak használat előtt bontsa fel. A táplevest lehetőleg ne érje fény. A közvetlenül a felhasználásig a címkén szereplő utasítás szerint kémcsőbe töltött táptalaj a szavatossági időig inokulálható,

és az ajánlott inkubációs időpontokig inkubálható, a mycobacterium-táptalajok esetén akár 8 hétig is. Inokulálás előtt hagyja a tápközeget szobahőmérsékletre felmelegedni.

A termék károsodása: Ne használja a csöveket, ha azon mikrobiális szennyeződést, elszíneződést, kiszáradást, illetve a károsodás bármilyen más jelét észleli.

VIII MINTAGYÚJTÁS ÉS A MINTÁKKAL VALÓ BÁNÁSMÓD

A tenyésztésre alkalmas mintákkal a különböző technikáknak megfelelően kell bántani. A további eljárásokról bővebb információt olvashat az idevonatkozó szakirodalomban.^{5,6} A mintákat lehetőleg az antimikrobiális kezelés megkezdése előtt kell levenni. Gondoskodni kell a haladéktalan laboratóriumba szállításról.

IX ELJÁRÁS

Szállított anyagok: Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

Szükséges, de nem szállított anyagok: Kiegészítő táptalajok, reagensek, a minőségellenőrzéshez szükséges mikroorganizmusok, laboratóriumi eszközök, az előírásoknak megfelelően.

A teszt kivitelezése: Alkalmazzon steril módszereket.

Az inokulálás után helyezze a csöveket egy megfelelő rendszerbe, amely 5–10% széndioxiddal dúsított aerob légteret biztosít. Inkubálja a csöveket $35 \pm 2^\circ\text{C}$ -on legfeljebb 8 hétig. Az első 3 hétben a kémcsövek záródugóit ki kell lazítani annak érdekében, hogy a széndioxid szabadon cirkulálhasson a növekedés elindításához. Ezután a kiszáradás megakadályozása érdekében szorítsa meg a záródugókat; hetente egyszer rövid időre lazítsa fel azokat.

Felhasználói minőség-ellenőrzés: Lásd „A minőségellenőrzés módszere” című fejezetben.

A tápközegeket a megfelelő minőségellenőrző organizmusokkal teszteltük, amely tesztelés megfelel a vonatkozó termékkövetelményeknek, illetve a CLSI szabványoknak. A minőségellenőrzési tesztelést a vonatkozó helyi, állami, szövetségi vagy országos előírásoknak, illetve jóváhagyási követelményeknek megfelelően, és/vagy az adott laboratórium saját szokványos minőségellenőrzési eljárásai szerint kell elvégezni.

X EREDMÉNYEK

A tenyészeteket az inokulációt követően 5–7 nap múlva, azt követően pedig hetente egyszer, legfeljebb 8 héten át kell ellenőrizni. A táplevest tartalmazó csövekben kinőtt mycobacteriumok felhasználhatók szükség esetén további laboratóriumi tesztelési eljárásokhoz.

XI AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

Az azonosításhoz a mikroorganizmusok tiszta tenyészetére van szükség. A végső azonosításhoz morfológiai, biokémiai és/vagy szerológiai tesztek elvégzése is szükséges. A további eljárásokról bővebb információt talál az idevonatkozó szakirodalomban.⁵⁻⁷

XII TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

Kiadás előtt a Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol minden gyártási sorozata teljesítményjellemzőit ellenőrzik. 0,01 mL-es kalibrált kaccsal a tétel reprezentatív mintáját inokulálják milliliterenként 10^3 telepképző egységre hígított (CFU) *Mycobacterium kansasii*, I. csoport (ATCC 12478), *M. scrofulaceum*, II. csoport (ATCC 19981), *M. intracellulare*, III. csoport (ATCC 13950), *M. fortuitum*, IV. csoport (ATCC 6841) és *M. tuberculosis* (ATCC 25177) tenyészettel. Az inokuláció után a meglazított zárókupakú kémcsöveket $35 \pm 2^\circ\text{C}$ -on, 5–10% széndioxiddal dúsított légtérben inkubálják. A kémcsövekben 7, 14 és 21 nap után megvizsgálják a növekedést. Mindegyik mikroorganizmus közepes vagy erős növekedést mutat 21 napon belül.

XIII KISZERELÉS

Kat. sz.	Leírás
221832	BD BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 mL

XIV IRODALOMJEGYZÉK

1. Middlebrook, G. 1955. Fitzsimmons Army Hospital Report No. 1, Denver.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am. J. Public Health.* 48:844-853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, and W.B. Schaefer. 1954. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III. The isolation, drug-susceptibility and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. *Am. Rev. Tuberc.* 70:852-872.
4. U.S. Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. 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.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. 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.

Műszaki szerviz BD Diagnostics: Az Amerikai Egyesült Államokon kívül vegye fel a kapcsolatot a BD képviselőjével, vagy munkatársainkkal a www.bd.com/ds címen.



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