

I WPROWADZENIE

Bulion z glicerolem Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol jest nieselektywną pożywką do hodowli prątków.

II PROCEDURA TESTU**A. Procedura przygotowania inokulum**

1. Na skośnych podłożach Lowenstein-Jensen zaszczerpić hodowle macierzyste odpowiednich szczepów prątków, używając sterylnych pałeczek do inokulacji.
2. Inkubować próbówki z poluzowanymi nakrętkami w środowisku tlenowym wzbogaconym dwutlenkiem węgla (5–10%), w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$, aż do uzyskania intensywnego wzrostu (zwykle po 2–3 tygodniach).
3. Zebrać wyhodowane kultury za pomocą sterylnego, zaostrego aplikatora. Delikatnie zbierać komórki z powierzchni podłoża, uważając, by nie zagarnąć podłoża razem z zebrany materiałem komórkowym.

a. W przypadku szczepu *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:

- (1) Przenieść hodowlę do 5,0 mL bulionu z glicerolem Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol w sterylnej szklanej probówce z zakrętką, zawierającej sterylne paciorki szklane.
- (2) Dokładnie odwirować (przez kilka minut), tak aby zawiesina nie zawierała dużych zgrupowań.
- (3) Porównać zawiesinę ze wzorcem nefelometrycznym McFarland nr 1. Zawiesina powinna być bardziej mętna niż wzorzec.
- (4) Umieścić probówkę w statywie i pozostawić na 2–3 godziny w temperaturze pokojowej, aby większe cząstki osiadły na dnie.
- (5) Przenieść supernatant do sterylnego pojemnika.
- (6) Skorygować zmętnienie zawiesiny do wzorca McFarland nr 1 (10^8 CFU/mL), powoli dodając sterylny bulion z gliceryną Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol. Energicznie wstrząsnąć.
- (7) Przed użyciem rozcieńczyć do 10^5 CFU/mL. Dokładnie wymieszać i wykonać posiew pożywki testowej za pomocą ezy kalibrowanej (0,01 mL).

b. W przypadku wszystkich innych szczepów prątków:

- (1) Przenieść hodowlę do sterylnej 50 mL zakręcannej probówki do wirówek, zawierającej 8–12 sterylnych paciorków szklanych (o średnicy 2 mm) i 5 mL rozcieńczalnika do hodowli prątków przygotowanego w następujący sposób:
 - Wymieszać następujące składniki w butelce o pojemności 1 L i skorygować odczyn pH do 6,7–7,0, 1N wodorotlenkiem sodu:

albumina surowicy wołowej (bez kwasów tłuszczowych)	1,0 g
polysorbate 80	0,1 mL
woda oczyszczona	500 mL
 - Poddać sterylizacji, przesączając przez błonę filtracyjną (filtr 0,2 μ).
 - W sposób jałowy, rozlać po 5,5 mL do sterylnych zakręcanych probówek do wirówek.
- (2) Za pomocą aplikatora wytworzyć emulsję hodowli prątków na ściankach bocznych zakręcannej probówki do wirówek. Wymieszać hodowlę z rozcieńczalnikiem.
- (3) Zakręcić probówkę i wirować przez około 10 minut, aż do wytworzenia zawiesiny bakterii, która nie zawiera dużych zgrupowań.
- (4) Dodać 15 mL sterylnego rozcieńczalnika do hodowli prątków i dokładnie wymieszać.
- (5) Porównać zawiesinę ze wzorcem nefelometrycznym McFarland nr 1. Zawiesina powinna być bardziej mętna niż wzorzec.

- (6) Umieścić probówkę w statywie i pozostawić na 2–3 godziny w temperaturze pokojowej, aby większe cząstki osiadły na dnie.
- (7) Pobrać supernatant i przenieść do sterylnego pojemnika. Zawiesina musi być bardziej mętna od wzorca McFarland nr 1 i nie może zawierać dużych cząstek. Jeśli nadal obecne są duże cząstki, wymieszać zawiesinę i pozostawić bez ruchu na 1 godzinę. Przenieść supernatant do sterylnego pojemnika.
- (8) Skorygować zmętnienie zawiesiny do wzorca McFarland nr 1 (10^8 CFU/mL), powoli dodając sterylny rozcieńczalnik do prątków. Energicznie wstrząsnąć.
- (9) Rozlać porcje zawiesiny do fiolek przystosowanych do zamrażania, opatrzonych etykietami z nazwą drobnoustrojów i datą sporządzenia.
- (10) Zamrozić zawiesiny, umieszczając fiołki w chłodziarce niskotemperaturowej, w temperaturze -60°C . Fiołki można przechować maks. 6 miesięcy.
- (11) Gdy zajdzie potrzeba, wyjąć zamrożoną fiołkę z chłodziarki i szybko rozmrozić zawartość, umieszczając probówkę w łaźni wodnej o temperaturze $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$. Przed użyciem rozcieńczyć do 10^5 CFU/mL. Dobrze wymieszać i wykonać posiew pożywki testowej za pomocą ezy kalibrowanej (0,01 mL).

B. Procedura badania pożywki

1. Zaszczepić podłoża reprezentatywnymi próbkami wymienionych szczepów.
 - a. Za pomocą jednorazowych ezy kalibrowanych (0,01 mL) wykonać posiew hodowli prątków przygotowanych zgodnie z powyższą procedurą w probówkach.
 - b. Inkubować próbki z poluzowanymi zakrętkami, w temperaturze $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, w środowisku tlenowym wzbogaconym dwutlenkiem węgla.
2. Po 7, 14 i w razie potrzeby po 21 dniach skontrolować próbki, oceniając stopień wzrostu i zabarwienie.
3. Oczekiwane wyniki

Drobnoustroje kontrolne CLSI	ATCC	Odzyskanie
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Wzrost
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , grupa I	12478	Wzrost
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , grupa II	19981	Wzrost
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , grupa III	13950	Wzrost
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , grupa IV	6841	Wzrost

*Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

1. Ocenic próbki według opisu w rozdz. „Pogorszenie jakości produktu”.
2. Wzrokowo ocenić reprezentatywne próbki, aby upewnić się, że żadne istniejące wady fizyczne nie będą przeszkadzały w ich użytkowaniu.
3. Inkubować reprezentatywne próbki bez wysianych drobnoustrojów w temperaturze $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ i $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$ i ocenić po 7 dniach pod względem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJA O PRODUKCIE

IV PRZEZNACZENIE

Bulion glicerynowy Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol jest wzbogaconą pożywką umożliwiającą rozwój prątków, w tym *M. tuberculosis*. Stosowany jest przede wszystkim do czystych hodowli prątków w badaniach laboratoryjnych.

V STRESZCZENIE I WYJAŚNIENIA

Middlebrook i współpracownicy wynaleźli skład bulionu 7H9 w tym samym czasie, kiedy opracowali podłoże agarowe 7H10.¹⁻³ Oba rodzaje podłoży pozwalają na wzrost gatunków prątków, jeżeli wzbogacone są o takie składniki odżywcze, jak glicerol, kwas olienowy, albumina i dekstroza, z wyjątkiem *M. bovis*, którego rozwój jest hamowany przez glicerol.

To podłoże jest stosowane do przygotowania inokulum do badań przeciwbakteryjnych, jako podłoże podstawowe do testów biochemicznych oraz do hodowli szczepów macierzystych.

VI ZASADY PROCEDURY

Duża ilość soli nieorganicznych, zawarta w tym podłożu, dostarcza substancji niezbędnych do rozwoju prątków. Cytrynian sodu, po przekształceniu w kwas cytrynowy, służy do utrzymywania pewnych kationów nieorganicznych w roztworze. Chlorek sodu, albumina wołowa, dekstroza i katalaza są składnikami wzbogacającymi Middlebrook ADC Enrichment. Albumina pełni rolę ochronną, wiążąc wolne kwasy tłuszczowe, które mogą być toksyczne dla gatunków *Mycobacterium*. Katalaza niszczy toksyczne nadtlenki, które mogą być obecne w pożywce. Źródło energii stanowi dekstroza. Chlorek sodu dostarcza niezbędnych elektrolitów. Suplementacja za pomocą glicerolu wpływa na rozwój prątków.

VII ODCZYNNIKI

Pożywka bulionowa Middlebrook 7H9 Broth

Przybliżony skład* w przeliczeniu na 1 litr wody oczyszczonej

Fosforan jednopotasowy	2,0 g	Cytrynian amonowo-żelazowy	0,04 g
Fosforan dwusodowy	1,5 g	Siarczan magnezu	0,05 g
Glutaminian jednosodowy	0,5 g	Siarczan cynku	0,001 g
Cytrynian sodu	0,1 g	Siarczan miedzi	0,001 g
Siarczan amonu	0,5 g	Biotyna	0,5 mg
Pirydoksyna	0,001 g	Chlorek wapnia	0,5 mg

*Skorygowany lub uzupełniony zgodnie z wymaganiami kryteriów działania.

Pełna pożywka w przygotowanych probówkach, oprócz wymienionych wyżej składników, zawiera na litr 2 mL glicerolu oraz składniki wzbogacające ADC, czyli:

Chlorek sodu	0,85 g
Albumina wołowa (frakcja V)	5,0 g
Dekstroza	2,0 g
Katalaza	4,0 mg
Pirogronian sodu	1,0 g

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

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

Podczas pracy z próbkami klinicznymi, jeżeli nie są wytwarzane aerozole, np. przy przygotowywaniu rozmazów kwasoopornych, należy przestrzegać zasad postępowania i procedur oraz stosować wyposażenie ochronne i pomieszczenia właściwe dla II klasy poziomu bezpieczeństwa biologicznego. Wszystkie czynności, w których wyniku powstają aerozole, należy przeprowadzać w komorze o I lub II klasie bezpieczeństwa biologicznego. Podczas procedur laboratoryjnych obejmujących namnażanie i badanie hodowli *M. tuberculosis* oraz *M. bovis* wymagane jest stosowanie zasad, sprzętu i pomieszczeń spełniających normy bezpieczeństwa biologicznego III poziomu. Badania na zwierzętach również wymagają specjalnych procedur.⁴

Podczas wykonywania wszystkich procedur należy przestrzegać aseptycznej techniki pracy i obowiązujących środków ostrożności dotyczących zagrożenia mikrobiologicznego. Po wykorzystaniu gotowe probówki, pojemniki na próbki oraz inne materiały skażone należy przed wyrzuceniem poddać sterylizacji w autoklawie.

Instrukcje dotyczące przechowywania: Otrzymane probówki umieścić i przechowywać w ciemnym miejscu, w temperaturze 2–8°C. Unikać zamrażania i przegrzewania. Otwierać dopiero bezpośrednio przed użyciem. Ograniczać do minimum 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 okres, również przez 8 tygodni w przypadku pożywek mykobakteriologicznych.

Pogorszenie jakości produktu: Nie używać probówek, jeżeli są widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, zmiana zabarwienia, wysychanie lub inne, świadczące 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 fachowym piśmiennictwie.^{5,6} Próbkę należy pobrać przed podaniem środków przeciwbakteryjnych. Próbkę powinny zostać niezwłocznie dostarczone do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczane materiały: Bulion glicerynowy Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

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

Procedura testowa: Stosować techniki aseptyczne.

Po inokulacji umieścić próbki w odpowiednim systemie zapewniającym środowisko tlenowe wzbogacone 5–10-procentowym dwutlenkiem węgla. Inkubować w temperaturze $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ do 8 tygodni. Przez pierwsze 3 tygodnie utrzymywać poluzowane zakrętki probówek, aby umożliwić obieg dwutlenku węgla i rozwój. Później próbki należy zakręcić, aby zapobiec odwodnieniu; raz w tygodniu na krótko rozszczelnić.

Kontrola jakości przez użytkownika: Zobacz rozdz. „Procedury kontroli jakości”.

Każda partia podłoża została przetestowana przy użyciu odpowiednich drobnoustrojów do kontroli jakości. Ten rodzaj testowania jest zgodny ze specyfikacją produktu i standardami CLSI, jeśli mają zastosowanie. Jak zwykle, testy należy wykonać zgodnie z obowiązującymi wymogami kontroli jakości, wynikającymi z przepisów miejscowych, stanowych, federalnych lub krajowych, wymogami akredytacji i/lub rutynowymi procedurami kontroli jakości w danym laboratorium.

X WYNIKI

Hodowle należy obserwować przez 5–7 dni od posiewu, a potem raz w tygodniu, maksymalnie przez 8 tygodni. Wzrost prątków z probówek z bulionem można wykorzystać w miarę potrzeby do dodatkowych laboratoryjnych procedur testowych.

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 zalecanych procedur należy zapoznać się z odpowiednią literaturą.⁵⁻⁷

XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Przed dopuszczeniem do obrotu wszystkie serie bulionu glicerynowego Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol są sprawdzane pod względem ich skuteczności. Za pomocą kalibrowanej ezy 0,01 mL reprezentatywne próbki serii są zaszczepiane hodowlami rozcieńczonymi tak, aby zawierały 10^3 jednostek tworzących kolonię (colony-forming units, CFU) na 0,01 mL *Mycobacterium kansasii* Grupa I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Grupa II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Grupa III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Grupa IV (ATCC 6841) oraz *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Po wykonaniu posiewu próbki z poluzowanymi zakrętkami są inkubowane w temperaturze $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, w środowisku wzbogaconym dwutlenkiem węgla (5–10%). Po 7, 14 i 21 dniach próbki są kontrolowane pod względem stopnia rozwoju. Wszystkie drobnoustroje wykazują umiarkowany lub intensywny rozwój przed upływem 21 dni.

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Nr kat. Opis

221832 BD BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 mL

XIV PIŚMIENNICTWO

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.

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