



## PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE (Opcional)

### I INTRODUÇÃO

O Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (caldo de Middlebrook 7H9 com glicerol) é um meio de cultura não selectivo para o cultivo de micobactérias.

### II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

#### A. Procedimento para a preparação de inóculos

1. Inocular os tubos inclinados do Meio de Lowenstein-Jensen com culturas em stock das estirpes das micobactérias pertinentes utilizando varetas de inoculação esterilizadas.
2. Incubar os tubos com as tampas soltas numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono (5-10%) a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  até que seja obtido um crescimento elevado (normalmente no período de 2 a 3 semanas).
3. Proceder à colheita da cultura com uma vareta aplicadora esterilizada e pontiaguda, removendo suavemente as células da superfície do meio e com muito cuidado para não incluir o meio de cultura com a colheita de células.
  - a. Para o *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
    - (1) Transferir a cultura para o 5,0 mL de Caldo de Middlebrook 7H9 com glicerol num tubo de vidro esterilizado com tampa de rosca contendo esferas de vidro estéreis.
    - (2) Misturar bem num vortex (durante alguns minutos) até a suspensão ficar sem aglomerados de grande dimensão.
    - (3) Comparar esta suspensão com um nefelómetro padrão McFarland no. 1. A suspensão deverá apresentar uma turvação superior à do padrão.
    - (4) Colocar o tubo num suporte durante 2 a 3 h à temperatura ambiente para permitir que as partículas de grande dimensão assentem na parte inferior.
    - (5) Transferir o líquido sobrenadante para um recipiente esterilizado.
    - (6) Ajustar a turvação da suspensão para o padrão McFarland no. 1 ( $10^8$  CFU/mL), adicionando lentamente Caldo Middlebrook 7H9 com glicerol estéril. Misturar bem.
    - (7) Diluir para  $10^5$  CFU/mL antes de utilizar. Misturar bem e inocular o meio de teste utilizando uma ansa calibrada de 0,01 mL.
  - b. Para todas as estirpes de micobactérias:
    - (1) Transferir a cultura para um tubo de centrifugação esterilizado de 50 mL com tampa de rosca contendo de 8 a 12 esferas de vidro estéreis (2 mm de diâmetro) e 5 mL de Diluente Mycobacterium preparado da seguinte forma:
      - Misturar os ingredientes apresentados em seguida num frasco de 1 L e ajustar o pH, utilizando 1-N-hidróxido de sódio, de 6,7 para 7,0.  
Albumina bovina (sem ácidos gordos) ..... 1,0 g  
Polisorbato 80 ..... 0,1 mL  
Água purificada ..... 500 mL
      - Esterilizar por filtração por membrana (filtro de  $0,2 \mu$ )
      - Distribuir de forma aséptica, em quantidades de 5,5 mL, em tubos de centrifugação esterilizados com tampas de rosca.
    - (2) Emulsionar o crescimento das micobactérias na parede lateral de um tubo de centrifugação com tampa de rosca utilizando uma vareta aplicadora. Misturar a cultura com o diluente.
    - (3) Tapar o tubo e misturar em "vortex" durante aproximadamente 10 min até a cultura ficar devidamente suspensa e sem agregados de grande dimensão.
    - (4) Adicionar 15 mL de Diluente Mycobacterium estéril e misturar bem.
    - (5) Comparar esta suspensão com um nefelómetro padrão McFarland no. 1. A suspensão deverá apresentar uma turvação superior à do padrão.
    - (6) Colocar o tubo num suporte durante 2 a 3 h à temperatura ambiente para permitir que as partículas de grande dimensão assentem na parte inferior.

- (7) Aspirar o líquido sobrenadante e transferi-lo para um recipiente esterilizado. A suspensão deverá apresentar uma turvação superior à do padrão McFarland no. 1 e não deverá apresentar partículas de grande dimensão. Se ainda se verificar a existência de partículas de grande dimensão, misturar e deixar repousar por mais uma 1 h. Transferir o líquido sobrenadante para um recipiente esterilizado.
- (8) Ajustar a turvação da suspensão para o padrão McFarland no. 1 (10<sup>8</sup> CFU/mL), adicionando lentamente Diluente Mycobacterium estéril. Misturar bem.
- (9) Distribuir alíquotas da suspensão em frascos de congelação com uma etiqueta indicando a identificação dos organismos e a data da preparação.
- (10) Congelar as suspensões colocando os frascos num congelador de baixa temperatura a -60°C. Os frascos podem ser armazenados durante 6 meses, no máximo.
- (11) Quando for a altura da utilização, remover o frasco congelado do congelador e descongelar rapidamente o conteúdo, colocando o tubo em banho maria com uma temperatura entre 30 e 35°C. Diluir para 10<sup>5</sup> CFU/mL antes de utilizar. Misturar bem e inocular o meio de teste utilizando uma ansa calibrada de 0,01 mL.

#### B. Procedimento para testar o meio

1. Inocular as amostras representativas com as culturas listadas abaixo.
  - a. Utilizando ansas de inoculação esterilizadas descartáveis de 0,01 mL, inocular os tubos utilizando culturas preparadas através do método descrito em cima.
  - b. Incubar os tubos com as tampas soltas a 35 ± 2°C numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono.
2. Examinar os tubos após 7, 14 e, se necessário, 21 dias para observar o crescimento e pigmentação.
3. Resultados esperados

##### **Microorganismos de controlo do CLSI**

\**Mycobacterium tuberculosis* ..... Crescimento  
H37Ra ATCC 25177

\**Mycobacterium kansasii*, ..... Crescimento  
Grupo I ATCC 12478

\**Mycobacterium scrofulaceum*, ..... Crescimento  
Grupo II ATCC 19981

\**Mycobacterium intracellulare*, ..... Crescimento  
Grupo III ATCC 13950

\**Mycobacterium fortuitum*, ..... Crescimento  
Grupo IV ATCC 6841

\*Estirpe de organismo recomendada para o Controlo de Qualidade pelo Utilizador.

#### III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

1. Examinar os tubos como descrito em "Deterioração do Produto".
2. Examinar visualmente os tubos representativos para se certificar de que quaisquer defeitos físicos existentes não irão interferir com a utilização.
3. Incubar os tubos representativos não inoculados numa atmosfera aeróbia a uma temperatura de 20 – 25°C e 30 – 35°C e examinar após 7 dias para verificar se apresentam contaminação microbiana.

### INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

#### IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (caldo de Middlebrook 7H9 com glicerol) é um meio suplementado que suporta o crescimento de micobactérias, incluindo a *M. tuberculosis*. Este meio é principalmente utilizado para o crescimento de culturas puras de micobactérias para serem utilizadas em estudos laboratoriais.

#### V RESUMO E EXPLICAÇÃO

Middlebrook e seus colaboradores desenvolveram a formulação da base do caldo 7H9 ao mesmo tempo que inventaram a base de agar 7H10.<sup>1-3</sup> Ambos os tipos de meios suportam o crescimento de espécies de micobactérias, quando suplementados com nutrientes como, por exemplo, o

glicerol, ácido oleico, albumina e dextrose, à excepção no caso de *M. bovis* que é inibida pelo glicerol.

Este meio é utilizado na preparação de inóculos para ensaios antimicrobianos, como um meio basal para os testes bioquímicos e para a repicagem de estirpes derivadas.

## VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Os vários sais inorgânicos neste meio fornecem substâncias essenciais ao crescimento das micobactérias. O citrato de sódio, quando convertido em ácido cítrico, serve para manter determinados catiões inorgânicos na solução. O cloreto de sódio, albumina bovina, dextrose e catalase são componentes do suplemento de enriquecimento Middlebrook ADC Enrichment. A albumina actua como agente protector, ligando-se aos ácidos gordos livres que podem ser tóxicos para as espécies de *Mycobacterium*. A catalase destrói os peróxidos tóxicos que possam estar presentes no meio. A dextrose é uma fonte de energia. O Cloreto de sódio fornece os electrólitos essenciais. O meio suplementado com glicerol melhora o crescimento das micobactérias.

## VII REAGENTES

### Middlebrook 7H9 Broth

Fórmula Aproximada\* por Litro de Água Purificada

Fosfato monopotássico .....	2,0	g
Fosfato dissódico .....	1,5	g
Glutamato monossódico .....	0,5	g
Citrato de sódio .....	0,1	g
Sulfato de amónia .....	0,5	g
Piridoxina .....	0,001	g
Citrato de amónia férrico .....	0,04	g
Sulfato de magnésio .....	0,05	g
Sulfato de zinco .....	0,001	g
Sulfato de cobre .....	0,001	g
Biotina .....	0,5	mg
Cloreto de cálcio .....	0,5	mg

\*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

O meio completo dentro de tubos preparados, além dos ingredientes apresentados em cima, contém por cada litro 2 mL de glicerol e os componentes do suplemento de enriquecimento ADC, nomeadamente:

Cloreto de sódio .....	0,85	g
Albumina bovina (fracção V) .....	5,0	g
Dextrose .....	2,0	g
Catalase .....	4,0	mg
Piruvato de sódio .....	1,0	g

### Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Os tubos que têm as tampas fechadas devem ser abertos com cuidado para evitar lesões provocadas pela quebra do vidro.

Para as manipulações de amostras clínicas que produzem produtos não-aerossóis, tal como a preparação de esfregaços com coloração ácida rápida, são exigidas práticas e procedimentos, equipamento de contenção e instalações de Nível 2 de Biossegurança. Todas as actividades que geram aerossóis têm que ser executadas numa câmara de segurança biológica de Classe I ou II. Para as actividades laboratoriais de propagação e manipulação de culturas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, são exigidas práticas, equipamento de contenção e instalações de Nível 3 de Biossegurança. Os estudos animais também exigem procedimentos especiais.<sup>4</sup>

Cumprir as precauções estabelecidas contra riscos microbiológicos em todos os procedimentos. Após a utilização e antes de serem eliminados, esterilizar em autoclave os tubos preparados, os recipientes das amostras e outros materiais contaminados.

### **Instruções de armazenamento**

Após a recepção, armazenar os tubos no escuro a uma temperatura entre 2 e 8°C. Evitar congelar e aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. Os meios que se encontram dentro de tubos que sejam armazenados conforme indicado no rótulo, até pouco antes de serem utilizados, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante o período de incubação recomendado (até 8 semanas para os meios de de micobacteriologia). Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

### **Deterioração do produto**

Não utilizar os tubos que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secura ou outros sinais de deterioração.

## **VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS**

As amostras adequadas para cultura podem ser manipuladas com diversas técnicas. Para obter informações mais detalhadas, consulte os textos apropriados.<sup>5,6</sup> As amostras devem ser colhidas antes de serem administrados os agentes antimicrobianos. Devem tomar-se providências para a entrega imediata no laboratório.

## **IX PROCEDIMENTO**

### **Material fornecido**

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

### **Materiais necessários mas não fornecidos**

Meios de cultura auxiliares, reagentes, organismos de controlo de qualidade e equipamento de laboratório conforme necessário.

### **Procedimento do teste**

Cumprir as técnicas assépticas.

Após a inoculação, colocar os tubos num sistema adequado que forneça uma atmosfera aeróbia enriquecida com 5-10% de dióxido de carbono. Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante no máximo 8 semanas. Os tubos deverão ter as tampas desapertadas durante as primeiras 3 semanas para permitir a circulação do dióxido de carbono necessário para iniciar o crescimento. Decorrido este período, apertar as tampas para evitar a desidratação, desapertando durante alguns instantes uma vez por semana.

### **Controlo de qualidade pelo utilizador**

Consultar "Procedimentos de controlo de qualidade."

Cada lote de meio foi testado com microrganismos de controlo de qualidade adequados e estes testes cumprem as especificações do produto e as normas CLSI, quando aplicáveis. Como é norma, os testes de CQ devem ser realizados de acordo com os regulamentos locais, distritais, federais ou nacionais, os requisitos de acreditação e/ou os procedimentos padrão de controlo de qualidade do laboratório.

## **X RESULTADOS**

As culturas deverão ser lidas no período de 5 a 7 dias após a inoculação e, a partir daí, uma vez por semana durante 8 semanas. O crescimento de micobactérias dos tubos do caldo pode ser utilizado para procedimentos de testes laboratoriais adicionais, conforme seja considerado necessário.

## **XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

Para serem identificados, os organismos têm que estar numa cultura pura. Devem realizar-se testes morfológicos, bioquímicos e/ou serológicos para uma identificação final. Consultar os textos apropriados para obtenção de informações detalhadas e procedimentos recomendados.<sup>5-7</sup>

## **XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO**

Antes da entrega, todos os lotes de Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (caldo de Middlebrook 7H9 com glicerol) são testados quanto às suas características de desempenho. Utilizando uma ansa calibrada de 0,01 mL, as amostras representativas do lote são inoculadas com culturas diluídas

para conterem 10<sup>3</sup> unidades formadoras de colónias (CFU) por cada 0,01 mL de *Mycobacterium kansasii* Grupo I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Grupo II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Grupo III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Grupo IV (ATCC 6841) e *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Após a inoculação, os tubos são incubados com as tampas soltas a 35 ± 2°C numa atmosfera suplementada com dióxido de carbono entre 5 a 10%. Os tubos são lidos para verificar o crescimento após 7, 14 e 21 dias de incubação. Todos os organismos apresentam um crescimento moderado a elevado ao fim de 21 dias.

### XIII APRESENTAÇÃO

N.º de Cat. Descrição

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

### XIV BIBLIOGRAFIA

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.

Assistência Técnica e Suporte da BD Diagnostics: contacte o representante local da BD ou visite [www.bd.com/ds](http://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