

KALİTE KONTROLÜ PROSEDÜRLERİ (İsteğe Bağlı)**I GİRİŞ**

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (Gliserol içeren Middlebrook 7H9 Broth), mikobakterilerin kültürasyonunda kullanılan seçici olmayan bir kültür besiyeridir.

II PERFORMANS TESTİ PROSEDÜRÜ**A. İnokulum Hazırlık Prosedürü**

1. Steril inokülasyon çubuklarını kullanarak Lowenstein-Jensen Medium slantları ilgili mikobakteriyel suşların stok kültürleri ile inoküle edin.
2. Yoğun bir gelişim elde edilene kadar (genellikle 2 ila 3 hafta içerisinde) tüpleri kapakları gevşek bir halde karbondioksit açısından zenginleştirilmiş (%5 ila 10) aerobik atmosferde 35 ± 2 °C'de inkübe edin.
3. Hücre hasadı ile birlikte kültür besiyerini almamaya dikkat ederek hücreleri besiyerinin yüzeyinden yavaşça alarak gelişimi steril keskinleştirilmiş bir aplikatör çubukla hasat edin.

a. *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 için:

- (1) Gelişimi, steril cam kristaller içeren steril vida kapaklı cam bir tüpte 5,0 mL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol'e aktarın.
- (2) Süspansiyonu büyük pıhtılar yok olana kadar iyice vorteksleyin (birkaç dakika).
- (3) Bu süspansiyonu McFarland No. 1 nefelometre standardı ile kıyaslayın. Süspansiyon standarttan daha bulanık olmalıdır.
- (4) Tüpü bir hafta oda sıcaklığında 2 ila 3 s boyunca bekleterek büyük partiküllerin dibe çökmesini sağlayın.
- (5) Süpernatantı steril bir kaba aktarın.
- (6) Yavaşça steril Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol ekleyerek süspansiyonun türbiditesini McFarland No. 1 standardına (10^8 CFU/mL) ayarlayın. İyice çalkalayın.
- (7) Kullanmadan önce 10^5 CFU/mL'ye seyreltin. İyice karıştırın ve 0,01 mL kalibre edilmiş öze kullanarak test besiyerini inoküle edin.

b. Diğer tüm mikobakteriyel suşlar için:

- (1) Gelişimi, 8 – 12 steril cam kristal (2 mm çapında) ve aşağıdaki şekilde hazırlanmış 5 mL Mycobacterium Diluent içeren steril 50 mL vida kapaklı santrifüj tüpüne aktarın.
 - Aşağıdaki içeriği 1 L şişe içerisinde karıştırın ve 1 N sodyum hidroksit kullanarak pH değerini 6,7 – 7,0'a ayarlayın.
Sığır Albümini (yağ asitsiz) 1,0 g
Polisorbat 80..... 0,1 mL
Saf Su..... 500 mL
 - Membran filtrasyonu ile sterilize edin (0,2 µ filtre)
 - 5,5 mL'lik miktarları, aseptik olarak steril vida kapaklı santrifüj tüplerine koyun.
- (2) Bir aplikatör çubuk kullanarak vida kapaklı santrifüj tüpünün yan duvarına mikobakteriyel gelişimi emülsifiye edin. Gelişimi seyreltim sıvısı ile karıştırın.
- (3) Tüpü kapatın ve gelişim büyük pıhtılardan arınıp iyice süspanse olana kadar yaklaşık 10 dakika "vorteksleyin".
- (4) 15 mL steril Mycobacterium Diluent ekleyin ve iyice karıştırın.
- (5) Bu süspansiyonu McFarland No. 1 nefelometre standardı ile kıyaslayın. Süspansiyon standarttan daha bulanık olmalıdır.
- (6) Tüpü bir hafta oda sıcaklığında 2 ila 3 s boyunca bekleterek büyük partiküllerin dibe çökmesini sağlayın.
- (7) Süpernatantı çekin ve steril bir kaba aktarın. Süspansiyon bir McFarland No. 1 standardından daha bulanık olmalıdır ve büyük partiküller içermemelidir. Hala büyük partiküller mevcutsa, karıştırın ve 1 s daha bekletin. Süpernatantı steril bir kaba aktarın.
- (8) Yavaşça steril Mycobacterium Diluent ekleyerek süspansiyonun türbiditesini McFarland No. 1 standardına (10^8 CFU/mL) ayarlayın. İyice çalkalayın.
- (9) Süspansiyon miktarlarını, organizma kimliğini ve hazırlama tarihini belirtecek şekilde etiketlenen dondurucu flakonlarında dağıtın.
- (10) Flakonları -60 °C'de derin dondurucuda dondurun. Flakonlar 6 aya kadar saklanabilir.

- (11) Kullanmak için, donmuş flakonı dondurucudan çıkarın ve tüpü 30 ila 35 °C su banyosuna yerleştirerek içeriği hızla eritin. Kullanmadan önce 10⁵ CFU/mL'ye seyreltin. İyice karıştırın ve 0,01 mL kalibre edilmiş öze kullanarak test besiyerini inoküle edin.

B. Besiyerini Test Etme Prosedürü

1. Aşağıda listelenen kültürler ile temsili örnekleri inoküle edin.
 - a. Steril tek kullanımlık 0,01 mL kalibre edilmiş özelerle, yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan kültürleri kullanarak tüpleri inoküle edin.
 - b. Tüpleri kapakları gevşek bir halde 35 ± 2 °C'de karbondioksitle zenginleştirilen aerobik atmosferde inkübe edin.
2. 7, 14 ve gerekli ise 21 gün sonra tüpleri gelişim ve pigmentasyon açısından inceleyin.
3. Beklenen Sonuçlar

CLSI Organizmaları	ATCC	Geri Kazanım
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Gelişim
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , Grup I	12478	Gelişim
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , Grup II	19981	Gelişim
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , Grup III	13950	Gelişim
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , Grup IV	6841	Gelişim

*Kullanıcı tarafından Kalite Kontrolü için tavsiye edilen organizma.

III EK KALİTE KONTROLÜ

1. Tüpleri "Ürünün Bozulması" altında tanımlandığı şekilde inceleyin.
2. Mevcut olan herhangi bir fiziksel bozukluğun kullanımı etkilemeyeceğinden emin olmak için temsili tüpleri görsel olarak inceleyin.
3. İnoküle edilmemiş temsili tüpleri aerobik ortamda 20 – 25 °C ve 30 – 35 °C'de inkübe edin ve 7 gün sonra mikrobiyal kontaminasyon açısından inceleyin.

ÜRÜN BİLGİLERİ

IV KULLANIM AMACI

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, *M. tuberculosis* de dahil olmak üzere mikobakterilerin gelişmesini destekleyen zenginleştirilmiş bir besiyeridir. Esas olarak laboratuvar çalışmalarında kullanmak için saf mikobakteri kültürlerinin geliştirilmesi için kullanılır.

V ÖZET VE AÇIKLAMA

Middlebrook ve iş arkadaşları, 7H9 broth base formülasyonunu, 7H10 agar base'i tasarladıkları dönemde geliştirdiler.¹⁻³ Her iki besiyeri tipi, gliserol, oleik asit, albümin ve dektroz gibi besinler ile zenginleştirildiğinde, gliserol ile inhibe olan *M. bovis* haricinde, mikobakteriyel türlerin gelişimini destekler.

Bu besiyeri, antimikrobiyal testler için inokulumların hazırlanmasında, biyokimyasal testler için bazal bir besiyeri olarak ve stok suşların alt kültürünün oluşturulmasında kullanılır.

VI PROSEDÜR İLKELERİ

Bu besiyerindeki çok sayıda inorganik tuz, mikobakterilerin gelişmesi için gerekli maddeleri sağlar. Sodyum sitrat, sitrik aside çevrildiğinde, çözeltideki belirli inorganik katyonları tutma görevini üstlenir. Sodyum klorür, sıgır albümini, dektroz ve katalaz, Middlebrook ADC Enrichment bileşenleridir. Albümin, *Mycobacterium* türlerine karşı zehirli olabilen serbest yağ asitlerini bağlayarak koruyucu bir ajan görevi görür. Katalaz, besiyerinde bulunma ihtimali olan zehirli peroksitleri parçalar. Dektroz bir enerji kaynağıdır. Sodyum klorür temel elektrolitleri sağlar. Gliserol ile zenginleştirme, mikobakteri gelişiminin artırılmasını sağlar.

VII REAKTİFLER

Middlebrook 7H9 Broth

1 Litre Saf Su için Yaklaşık Formül*

Monopotasyum Fosfat	2,0 g	Ferrik Amonyum Sitrat.....	0,04 g
Disodyum Fosfat	1,5 g	Magnezyum Sülfat.....	0,05 g
Monosodyum Glutamat.....	0,5 g	Çinko Sülfat	0,001 g
Sodyum Sitrat	0,1 g	Bakır Sülfat	0,001 g
Amonyum Sülfat.....	0,5 g	Biyotin.....	0,5 mg
Piridoksin	0,001 g	Kalsiyum Klorür	0,5 mg

*Performans kriterlerini karşılamak üzere gereken şekilde ayarlanmış ve/veya desteklenmiştir.

Hazır tüplerdeki tam besiyeri, yukarıda listelenen bileşenlere ek olarak, bir litrede 2 mL gliserol ve ADC zenginleştirme bileşenlerini içerir, yani:

Sodyum Klorür	0,85 g
Sığır Albümini (Fraksiyon V)	5,0 g
Dekstroz	2,0 g
Katalaz	4,0 mg
Sodyum Piruvat.....	1,0 g

Uyarılar ve Önlemler: *In vitro* Diyagnostik Kullanım içindir.

Sıkılmış kapaklı tüpler, camın kırılmasına bağlı yaralanmaları önlemek için dikkatli bir şekilde açılmalıdır.

Aside dirençli smear'ların hazırlanması gibi klinik örneklerin aerosol üretmeyen işlemleri sırasında Biyogüvenlik Seviyesi 2 uygulamaları ve prosedürleri, saklama ekipmanı ve tesisleri kullanılmalıdır. Aerosol üreten tüm aktiviteler, Sınıf I veya II biyolojik güvenlik kabini içinde gerçekleştirilmelidir. *M. tuberculosis* ve *M. bovis* kültürlerinin hazırlanması ve manipülasyonundaki laboratuvar faaliyetleri için Biyolojik Güvenlik Düzeyi 3 uygulamaları, izolasyon ekipmanları ve araçları gereklidir. Hayvan çalışmaları da özel prosedürler gerektirir.⁴

Tüm prosedürler boyunca mikrobiyolojik tehlikelere karşı uygun aseptik teknikleri ve belirlenen önlemleri uygulayın. Kullanımdan sonra, hazırlanan tüpler, örnek kapları ve diğer kontamine olmuş malzemeler atılmadan önce otoklavlanarak sterilize edilmelidir.

Saklama Talimatları: Alındıktan sonra, tüpleri karanlıkta 2 ila 8°C'de saklayın. Dondurmaktan ve fazla ısıtmaktan kaçının. Kullanıma hazır olana kadar açmayın. Işığa maruz kalmamasını sağlayın. Kullanım öncesine kadar etikette belirtildiği şekilde saklanan tüp besiyeri, son kullanma tarihine kadar inoküle edilebilir ve mikobakteriyoloji besiyeri için 8 haftaya kadar, önerilen inkübasyon sürelerinde inkübe edilebilir. Besiyerinin inokülasyon öncesinde oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.

Ürünün Bozulması: Mikrobiyal kontaminasyon belirtileri, renk değişimi, kuruma veya diğer bozulma belirtileri görmeniz halinde tüpleri kullanmayın.

VIII ÖRNEK TOPLAMA VE İŞLEME

Kültür için uygun örnekler çeşitli teknikler kullanılarak işlenebilir. Ayrıntılı bilgi için ilgili metinlere bakın.^{5,6}

Örnekler, antimikrobiyal ajanlar verilmeden önce alınmalıdır. Örneklerin laboratuvara hızlı bir şekilde ulaştırılması için gerekli düzenlemeler yapılmalıdır.

IX PROSEDÜR

Sağlanan malzemeler: Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

Gerekli fakat sağlanmamış malzemeler: Yardımcı kültür ortamı, reaktifler, kalite kontrol organizmaları ve gerekli laboratuvar ekipmanı.

Test Prosedürü: Aseptik teknikleri uygulayın.

İnokülasyonu takiben, tüpleri, %5 – 10 karbondioksit ile zenginleştirilmiş aerobik bir atmosfer sağlayan uygun bir sisteme yerleştirin. Tüpleri 35 ± 2 °C'de 8 haftaya kadar inkübe edin. Tüplerin kapaklarını gelişmenin başlaması için karbondioksitin dolaşımına izin vermek için ilk 3 hafta gevşek bırakın. Sonrasında, dehidrasyonu önlemek için, kapakları sıkıştırın; haftada bir defa kısa bir süre için gevşek bırakın.

Kullanıcı tarafından Kalite Kontrolü: "Kalite Kontrolü Prosedürleri"ne bakın.

Her bir ortam lotu uygun kalite kontrol organizmaları kullanılarak test edilmiştir; bu test, ürünün teknik özelliklerini ve ilgili olduğu yerlerde CLSI standartlarını karşılamaktadır. Her zamanki gibi gerekli kalite kontrolleri ilgili yerel, resmi, federal düzenlemelere veya ülke düzenlemelerine, akreditasyon gerekliliklerine ve/veya laboratuvarınızın standart kalite kontrol prosedürlerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

X SONUÇLAR

Kültürler inokülasyondan sonraki 5 ila 7 gün içerisinde ve sonrasında 8 haftaya kadar haftada bir kez okunmalıdır. Broth tüplerinden mikobakteriyel gelişim, ek laboratuvar test prosedürleri için gerektiği gibi kullanılabilir.

XI PROSEDÜRÜN KISITLI OLDUĞU ALANLAR

Teşhis için, organizmalar saf kültürde bulunmalıdır. Nihai teşhis için morfolojik, biyokimyasal ve/veya serolojik testler gerçekleştirilmelidir. Detaylı bilgiler ve tavsiye edilen prosedürler için ilgili metinlere bakın.⁵⁻⁷

XII PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Piyasaya sürülmeden önce tüm Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol lotları performans özellikleri açısından test edilir. 0,01 mL kalibre edilmiş öze kullanılarak, temsili lot örnekleri, 0,01 mL *Mycobacterium kansasii* Grup I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Grup II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Grup III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Grup IV (ATCC 6841) ve *M. tuberculosis* (ATCC 25177) içerisinde 10³ koloni oluşturu birim (CFU) içerecek şekilde seyreltilmiş kültürler ile inoküle edilir. Aşılama işleminden sonra tüpler, kapakları gevşek bir halde, %5 – 10 karbondioksitle desteklenmiş bir ortamda 35 ± 2°C'de inkübe edilir. Tüpler, inkübasyon sonrasındaki 7, 14 ve 21. günde gelişim açısından okunur. 21 gün içinde tüm organizmalar orta ile yoğun gelişim gösterir.

XIII TİCARİ TAKDİM ŞEKLİ

Kat. No.	Açıklama
221832	BD BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 mL

XIV REFERANSLAR

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.

BD Diagnostics Teknik Desteği: yerel BD temsilcinizle temasa geçin veya www.bd.com/ds adresine başvurun.



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