

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE**I INTRODUÇÃO**

O Middlebrook and Cohn 7H10 Agar é um meio de cultura para crescimento de micobactérias.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO**A. Procedimento para Preparação de Inóculos**

1. Utilizando varetas de inoculação estéreis, inocule ágaros inclinados de Lowenstein-Jensen Medium com culturas de reserva das estirpes de micobactérias pertinentes.
2. Incube os tubos com as tampas desapertadas, a 35 ± 2 °C, numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono, até ocorrer um crescimento intenso (normalmente no prazo de 2 a 3 semanas).
3. Efectue a colheita da cultura com uma vareta aplicadora estéril pontiaguda, removendo as células da superfície do meio com cuidado para não incluir o meio de cultura na colheita de células.

a. Para o *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:

- (1) Transfira a cultura para 5,0 mL de Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol num tubo de vidro estéril com tampa roscada contendo esferas de vidro estéreis.
- (2) Misture bem no agitador de vórtice (alguns minutos), até a suspensão deixar de ter grandes aglomerados.
- (3) Compare esta suspensão com um padrão n.º 1 de McFarland no nefelómetro. A suspensão deve estar mais turva do que o padrão.
- (4) Coloque o tubo num suporte durante 2 a 3 h, à temperatura ambiente, para permitir que as partículas de maiores dimensões se depositem no fundo.
- (5) Transfira o sobrenadante para um recipiente estéril.
- (6) Ajuste a turvação da suspensão para um padrão n.º 1 de McFarland, adicionando lentamente Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol estéril. Agite bem.
- (7) Antes de utilizar, dilua para 10^5 UFC/mL. Misture bem e inocule o meio de teste com uma ansa calibrada de 0,01 mL, fazendo riscas sobre o ágar.

b. Para todas as outras estirpes de micobactérias:

- (1) Transfira a cultura para um tubo de centrífuga de 50 mL com tampa de rosca, estéril, contendo 8 a 12 esferas de vidro estéreis (2 mm de diâmetro) e 5 mL de Diluente de micobactérias, conforme se segue:

- Misture os seguintes ingredientes num frasco de 1 L e ajuste o pH, utilizando hidróxido de sódio 1 N, para 6,7 a 7,0

Albumina bovina (sem ácidos gordos).....	1,0	g
Polisorbato 80	0,1	mL
Água purificada	500	mL

- Esterilize através de filtração com membrana (filtro de 0,2 µ)
 - Distribua, de forma asséptica, volumes de 5,5 mL para tubos estéreis com tampa roscada.
- (2) Utilizado uma vareta aplicadora, emulsione a cultura de micobactérias na parede lateral de um tubo de centrífuga com tampa roscada. Misture totalmente a cultura com o diluente.
 - (3) Tape o tubo e misture no agitador de vórtice durante aproximadamente 10 min, até a cultura ficar em suspensão e não apresentar grandes aglomerados.
 - (4) Adicione 15 mL de Diluente de micobactérias estéril e misture totalmente.
 - (5) Compare esta suspensão com um padrão n.º 1 de McFarland no nefelómetro. A suspensão deve estar mais turva do que o padrão.
 - (6) Coloque o tubo num suporte durante 2 a 3 h, à temperatura ambiente, para permitir que as partículas de maiores dimensões se depositem no fundo.
 - (7) Aspire o sobrenadante e transfira-o para um recipiente estéril. A suspensão deve ficar mais turva do que um padrão n.º 1 de McFarland e não apresentar grandes aglomerados. Se ainda existirem partículas de grandes dimensões, misture e deixe repousar durante mais 1 h. Transfira o sobrenadante para um recipiente estéril.
 - (8) Ajuste a turvação da suspensão para um padrão n.º 1 de McFarland, adicionando lentamente Diluente de micobactérias estéril. Agite bem.
 - (9) Distribua alíquotas da suspensão em frascos para congelação, identificados com a identificação do microrganismo e a data de preparação.
 - (10) Congele as suspensões, colocando os frascos num congelador de baixa temperatura, a -60 °C. Os frascos podem ser armazenados até 6 meses.
 - (11) Quando for a altura da utilização, remover o frasco congelado do congelador e descongelar rapidamente o conteúdo, colocando o frasco em banho maria com uma temperatura entre 30 e 35 °C. Dilua para 10^5 UFC/mL antes de utilizar. Utilizando uma ansa calibrada de 0,01 mL, misture bem e inocule o meio de teste, fazendo riscas sobre o mesmo.

B. Procedimento para Meio de Teste

1. Inocule as amostras representativas com as culturas listadas abaixo.
 - a. Antes da inoculação, certifique-se de que as superfícies do ágar não contém humidade.
 - b. Utilizando ansas calibradas de 0,01 mL, estéreis e descartáveis, inocule os recipientes de teste com as culturas de micobactérias preparadas tal como foi acima descrito.
 - c. Incube os recipientes com as tampas desapertadas, a 35 ± 2 °C, numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono.
 - d. Inclua os tubos de Middlebrook 7H10 Agar, previamente testados, como controlos.
2. Examine os recipientes após 7 e 14 dias e, se necessário, 21 dias, verificando se existe crescimento, selecção e pigmentação.
3. Resultados esperados

Microrganismos	ATCC	Isolamento
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Crescimento
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , grupo I	12478	Crescimento
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , grupo II	19981	Crescimento
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , grupo III	13950	Crescimento
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , grupo IV	6841	Crescimento

*Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

NOTA: Deverá ser monitorizado pelos utilizadores de acordo com CLSI M22-A3.

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

1. Examine os tubos ou frascos, conforme descrito na secção "Deterioração do produto".
2. Examine visualmente os tubos ou frascos representativos, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.
3. Incube os tubos ou frascos representativos não inoculados entre 20 a 25 °C e 30 a 35 °C e examine-os após 7 dias, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Middlebrook and Cohn 7H10 Agar é utilizado em procedimentos qualitativos para isolamento e cultura de micobactérias.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

Ao longo dos anos, têm sido criados muitos meios de cultura para micobactérias. Os primeiros meios eram formulações à base de ovo e incluíam o Lowenstein-Jensen Medium e o Petragnani Medium. Dubos e Middlebrook contribuíram para o desenvolvimento de várias formulações que continham como ingredientes chave o ácido oleico e a albumina, para ajudar no crescimento de bacilos da tuberculose e para proteger os microrganismos contra diversos agentes tóxicos.¹ Subsequentemente, Middlebrook e Cohn melhoraram a formulação do ágar de ácido oleico e albumina e obtiveram um crescimento mais rápido e mais exuberante de espécies de *Mycobacterium* no seu meio, designado como 7H10.^{2,3} Foi referido que no meio 7H10 tendem a crescer menos contaminantes do que nos meios à base de ovo normalmente utilizados para cultura de micobactérias.⁴

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O Middlebrook and Cohn 7H10 Agar contém vários sais inorgânicos que fornecem substâncias essenciais para o crescimento de micobactérias. O citrato de sódio, quando convertido para ácido cítrico, serve para conservar alguns catiões inorgânicos em solução. O glicerol é uma fonte abundante de carbono e energia. O ácido oleico, bem como outros ácidos gordos de cadeia longa, pode ser utilizado pelos bacilos da tuberculose e desempenha um papel importante no metabolismo das micobactérias. O principal efeito da albumina é a protecção dos bacilos da tuberculose contra agentes tóxicos, aumentando assim o seu isolamento em meios primários. A catalase destrói os peróxidos tóxicos que possam estar presentes no meio. A inibição parcial de bactérias é conseguida pela presença do corante verde de malaquite.

VII REAGENTES

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Sulfato de magnésio	0,05	g
Citrato de amónio férrico	0,04	g
Citrato de sódio	0,4	g
Sulfato de amónio	0,5	g
Glutamato monossódico	0,5	g
Fosfato dissódico	1,5	g
Fosfato monopotássico	1,5	g
Ágar	13,5	g
Cloreto de sódio	0,85	g
Dextrose	2,0	g
Albumina bovina (Fracção V)	5,0	g
Catalase	3,0	mg
Piridoxina	1,0	mg
Sulfato de zinco	1,0	mg
Sulfato de cobre	1,0	mg
Biotina	0,5	mg
Cloreto de cálcio	0,5	mg
Verde de malaquite	0,25	mg
Ácido oleico	0,06	mL
Glicerol	5,0	mL

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

Advertências e Precauções: Para diagnóstico *in vitro*.

Os tubos e frascos com tampas apertadas devem ser abertos com cuidado, para evitar lesões devido a quebra do vidro.

Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"⁵⁻⁸ e as linhas de orientação da instituição. Antes de serem eliminados, esterilizar em autoclave os tubos preparados, os recipientes de amostras e outros materiais contaminados.

Para a preparação de amostras clínicas não produtoras de aerossóis, tais como a preparação de esfregaços ácidos rápidos, é necessária a adopção de práticas e procedimentos e a utilização de equipamentos e instalações de contenção do Nível 2 de Segurança Biológica. Todas as actividades que envolvam a produção de aerossóis devem ser executadas numa câmara de segurança biológica de Classe I ou II. Para as actividades laboratoriais que envolvam a propagação e manipulação de culturas de *M. tuberculosis* e *M. bovis* são necessárias as práticas, equipamento de contenção e instalações do Nível 3 de Segurança Biológica. Os estudos em animais também requerem procedimentos especiais.⁷

Instruções de armazenamento: Após a recepção, armazenar os tubos em local escuro entre 2 e 8 °C. Evitar congelar ou aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. Os meios que forem armazenados conforme indicado no rótulo até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante os períodos de incubação recomendados. Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

Deterioração do produto

Não utilizar tubos ou frascos que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras adequadas para cultura podem ser preparadas utilizando várias técnicas. Para obter informações pormenorizadas, consulte os textos apropriados.⁹⁻¹¹ As amostras devem ser obtidas antes de serem administrados agentes antimicrobianos. Devem tomar-se as providências necessárias para a entrega imediata no laboratório.

IX PROCEDIMENTO

Material fornecido: Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Material necessário mas não fornecido: Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Procedimento do teste: Utilize técnicas assépticas.

Os procedimentos de teste são os recomendados pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para isolamento primário de amostras contendo micobactérias.⁹ A solução de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) é recomendada como um agente de digestão e descontaminação suave mas eficaz. Estes reagentes são fornecidos no **BBL MycoPrep Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit** (Kit de digestão/descontaminação de amostras de micobactérias **BBL MycoPrep**). Para instruções pormenorizadas sobre a descontaminação e cultura, consulte uma referência bibliográfica apropriada.⁹⁻¹²

Após a inoculação, mantenha os recipientes protegidos da luz e coloque-os num sistema adequado para fornecimento de uma atmosfera aeróbia enriquecida com dióxido de carbono. Incube a 35 ± 2 °C.

Os meios de cultura em frasco com ágar inclinado devem ser inoculados num plano horizontal até o inóculo ser absorvido. Os tubos e os frascos devem ter as tampas roscadas desapertadas nas primeiras 3 semanas, de forma a permitir a circulação de dióxido de carbono para o início do crescimento. Depois, para evitar a desidratação, aperte as tampas; desape-te-as durante alguns instantes, uma vez por semana. Se houver problema de espaço, coloque os tubos em posição vertical.

NOTA: As culturas efectuadas a partir de lesões cutâneas em que há suspeita de terem *M. marinum* ou *M. ulcerans* devem ser incubadas entre 25 e 33 °C para isolamento primário; as culturas em que há suspeita de *M. avium* ou *M. xenopi* exibem um crescimento óptimo entre 40 e 42 °C.⁹ Incube uma cultura duplicada entre 35 e 37 °C.

Controlo de qualidade pelo utilizador: Consulte "Procedimentos do controlo de qualidade".

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas do CLSI e os regulamentos da CLIA que dizem respeito a este assunto, para obter orientações sobre práticas de controlo de qualidade apropriadas.

X RESULTADOS

As culturas devem ser lidas no prazo de 5 a 7 dias após a inoculação e, depois deste período, uma vez por semana até um período máximo de 8 semanas.

Registe as seguintes observações:⁹

1. Número de dias necessário para as colónias se tornarem macroscopicamente visíveis. As bactérias com crescimento rápido têm colónias maduras no prazo de 7 dias; as bactérias com crescimento lento necessitam de mais de 7 dias para até se formarem colónias maduras.
2. Número de colónias (frascos):
Sem colónias = Negativo
Inferior a 50 colónias = Contagem real
50 a 100 colónias = 1+
100 a 200 colónias = 2+
Praticamente confluentes (200 a 500) = 3+
Confluentes (mais de 500) = 4+
3. Produção de pigmento:
Branco, creme ou amarelo-claro = Não cromogéneo (NC)
Amarelo-limão, amarelo, laranja, vermelho = Cromogéneo (Ch)

Os esfregaços corados podem apresentar bacilos com coloração ácida rápida, que são referidos apenas como "bacilos com coloração ácida rápida", a não ser que sejam efectuados testes definitivos.

Os frascos podem ser examinados, invertendo-os sobre a plataforma de um microscópio de dissecação. Observe com uma ampliação de 10 a 60x, com luz transmitida. Observe rapidamente com ampliação de 10 a 20x, verificando se existem colónias. Uma ampliação superior é (30 a 60x) é útil para a observação da morfologia das colónias, por exemplo, colónias sinuosas em forma de corda.

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Para a identificação, os microrganismos devem ser uma cultura pura. Para uma identificação final, devem ser efectuados testes morfológicos, bioquímicos e/ou serológicos. Para obter informações pormenorizadas e sobre os procedimentos recomendados, consulte os textos apropriados.⁹⁻¹²

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Antes de serem comercializados, todos os lotes de recipientes de Middlebrook and Cohn 7H10 Agar são testados relativamente às características do desempenho. Utilizando um ansa calibrada de 0,01 mL, amostras representativas do lote são inoculadas, fazendo riscas sobre o ágar, com culturas diluídas até conterem 10⁵ unidades formadoras de colónias (UFC) por mL de *Mycobacterium kansasii* Grupo I (ATCC 21478), *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 recipientes são incubados com as tampas desapertadas, a 35 ± 2 °C, numa atmosfera suplementada com dióxido de carbono entre 5 e 10%. Os recipientes devem ser observados após 7, 14 e 21 dias de incubação, verificando se existe crescimento e pigmentação. Todos os microrganismos exibem crescimento moderado a intenso no prazo de 21 dias. A pigmentação das colónias é a seguinte: o *M. kansasii* exhibe colónias brancas a creme; o *M. scrofulaceum* apresenta colónias de cor amarelo médio a laranja; o *M. tuberculosis*, o *M. intracellulare* e o *M. fortuitum* apresentam colónias cremes.

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat. Descrição

220958	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, emb. de 10 tubos A
220959	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, caixa de 100 tubos A
297448	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, emb. de 10 tubos C
297396	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, caixa de 100 tubos C
297274	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, frascos com 1 onça (30 mL), caixa de 100

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Dubos, R.J., and G. Middlebrook. 1947. Media for tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* 56:334-345.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am. J. Pub. Health.* 48:844-853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, and W.B. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* 38:66-81.
4. Kubica, G.P., and W.E. Dye. 1967. Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology. PHS Publication No. 1547. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Cernoch, P.L., R.L. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
12. Metchock, B.G., F.S. Nolte, and R.J. Wallace, Jr. 1999. *Mycobacterium*, p. 399-437. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenoever, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Assistência Técnica e Suporte da BD Diagnostics: contacte o representante local da BD ou visite 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