

KALİTE KONTROLÜ PROSEDÜRLERİ**I GİRİŞ**

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, mikobakterilerin kültivasyonu için 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 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 çubuk ile hasat edin.
 - a. *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 için:
 - (1) Gelişimi, steril cam kristalleri 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 ayarlayın. İyice çalkalayın.
 - (7) Kullanmadan önce 10^5 CFU/mL'ye seyreltin. İyice karıştırın ve 0,01 mL kalibre edilmiş öze kullanarak test besiyerini sürme yöntemi ile 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 ila 7,0'a ayarlayın.
Sığır Albümini (yağ asitsiz)1,0 g
Polisorbat 800,1 mL
Saf Su500 mL
 - Membran filtrasyonu ile sterilize edin (0,2 µ filtre).
 - 5,5 mL'lik miktarları aseptik olarak steril vida kapaklı tüplere 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 ayarlayın. İyice çalkalayın.
 - (9) Süspansiyon miktarlarını, organizma kimliğini ve hazırlama tarihini belirtecek şekilde etiketlenen dondurucu flakonlarına koyun.
 - (10) Flakonları -60 °C'de derin dondurucuda dondurun. Flakonlar 6 aya kadar saklanabilir.
 - (11) Kullanmak için, donmuş flakonun dondurucudan çıkarın ve flakonun 30 – 35 °C su banyosuna yerleştirilerek içeriği hızla eritin. Kullanmadan önce 10^5 CFU/mL'ye seyreltin. İyice karıştırın ve 0,01 mL kalibre edilmiş öze kullanarak test besiyerini sürme yöntemi ile inoküle edin.

B. Besiyerini Test Etme Prosedürü

- Aşağıda listelenen kültürlerle temsili örnekleri inoküle edin.
 - Inokülasyondan önce agar yüzeylerinin nemsiz olduğundan emin olun.
 - Steril tek kullanımlık 0,01 mL kalibre edilmiş özelerle, yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan mikobakteriyel kültürler kullanarak test kaplarını inoküle edin.
 - Bütün kapları, kapakları gevşek bir halde 35 ± 2 °C'de karbondioksit ile zenginleştirilen aerobik atmosferde inkübe edin.
 - Daha önceden test edilen Middlebrook 7H10 Agar tüplerini kontrol olarak dahil edin.
- 7, 14 ve gerekli ise 21 gün sonra kapları gelişim, seçicilik ve pigmentasyon açısından inceleyin.
- Beklenen Sonuçlar

Organizmalar	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.

NOT: Kullanıcılar tarafından CLSI M22-A3'e göre izlenmelidir.

III EK KALİTE KONTROLÜ

- Tüp veya şişeleri "Ürünün Bozulması" altında tanımlandığı şekilde inceleyin.
- Mevcut olan herhangi bir fiziksel bozukluğun kullanımı etkilemeyeceğinden emin olmak için temsili tüp veya şişeleri görsel olarak inceleyin.
- Inoküle edilmemiş temsili tüp veya şişeleri 20 – 25 °C ve 30 – 35 °C'de inkübe edin ve 7 gün sonra mikrobiyal kontaminasyon açısından inceleyin.

ÜRÜN BİLGİLERİ

IV KULLANIM AMACI

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, mikobakterilerin izolasyonu ve kültürasyonu için kalitatif prosedürlerde kullanılır.

V ÖZET VE AÇIKLAMA

Yıllar boyunca, mikobakterilerin kültürasyonu için birçok kültür besiyeri tasarlanmıştır. İlk tasarlananlar yumurta bazlı formülasyonlardır ve Lowenstein-Jensen Medium ve Petragani Medium'u içermektedir. Dubos ve Middlebrook, tüberkü basiliinin gelişmesine yardım etme ve organizmaları çeşitli zehirli ajanlara karşı korumada anahtar bileşenler olan oleik asit ve albümin içeren bazı formülasyonların geliştirilmesine aracı olmuştur.¹ Sonrasında, Middlebrook ve Cohn, oleik asit-albümin agar formülasyonunu geliştirmiş ve 7H10 olarak tanımlanan besiyeri üzerinde *Mycobacterium* türlerinin daha bol ve hızlı gelişimini elde etmiştir.^{2,3} 7H10 besiyerinin mikobakterilerin kültürasyonu için yaygın olarak kullanılan yumurta bazlı besiyerinden daha az kontaminant içermeye eğilimde olduğu bildirilmiştir.⁴

VI PROSEDÜR İLKELERİ

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, mikobakterilerin gelişimi için gerekli maddeleri sağlayan çeşitli inorganik tuzlar içerir. Sodyum sitrat, sitrik aside çevrildiğinde, çözeltideki belirli inorganik katyonları tutma görevini üstlenir. Gliserol bol karbon ve enerji kaynağıdır. Diğer uzun zincirli yağ asitlerinin yanı sıra oleik asit, tüberkü basili ile kullanılabilir ve mikobakterilerin metabolizmasında önemli bir rol oynar. Albüminin birincil etkisi zehirli ajanlara karşı tüberkü basiliinin korunmasıdır ve bu sebeple, birincil izolasyonda bunların geri kazanımını artırır. Katalaz, besiyerinde bulunma ihtimali olan zehirli peroksitleri parçalar. Bakterilerin kısmi inhibisyonu, malakit yeşili boya varlığı ile sağlanır.

VII REAKTİFLER

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

1 Litre Saf Su için Yaklaşık Formül*

Magnezyum Sülfat	0,05 g	Sığır Albümini (Fraksiyon V)	5,0 g
Ferrik Amonyum Sitrat	0,04 g	Katalaz	3,0 mg
Sodyum Sitrat	0,4 g	Piridoksin	1,0 mg
Amonyum Sülfat	0,5 g	Çinko Sülfat	1,0 mg
Monosodyum Glutamat	0,5 g	Bakır Sülfat	1,0 mg
Disodyum Fosfat	1,5 g	Biyotin	0,5 mg
Monopotasyum Fosfat	1,5 g	Kalsiyum Klorür	0,5 mg
Agar	13,5 g	Malakit Yeşili	0,25 mg
Sodyum Klorür	0,85 g	Oleik Asit	0,06 mL
Dekstroz	2,0 g	Gliserol	5,0 mL

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

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

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

Klinik örneklerde hepatit virüsü ve İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü de dahil olmak üzere patojenik mikroorganizmalar bulunabilir. Kan veya diğer vücut sıvılarıyla kontamine olan tüm öğelerle çalışırken, "Standard Precautions" (Standart Önlemler)⁵⁻⁸ ve kurumsal düzenlemeler takip edilmelidir. Hazır tüpleri, örnek kaplarını ve kontamine olmuş diğer malzemeleri atmadan önce otoklavlama yoluyla sterilize edin.

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 kabininde gerçekleştirilmelidir. *M. tuberculosis* ve *M. bovis* kültürlerinin propagasyonu ve manipülasyonundaki laboratuvar faaliyetleri için Biyolojik Güvenlik Düzeyi 3 uygulamaları, izolasyon ekipmanları ve araçları gereklidir. Hayvan çalışmaları da özel prosedürler gerektirir.⁷

Saklama Talimatları: Alındıktan sonra, tüpleri ve şişeleri karanlıkta 2 – 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 besiyeri, son kullanma tarihine kadar inoküle edilebilir ve 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 ve şişeleri kullanmayın.

VIII ÖRNEK TOPLAMA VE İŞLEME

Kültür için uygun örnekler çeşitli teknikler kullanılarak işlenebilir. Ayrıntılı bilgi için ilgili metinlere bakın.⁹⁻¹¹ Örnekler, antimikrobiyal ajanlar verilmeden önce alınmalıdır. Örneklerin laboratuvara hızlı bir şekilde ulaştırılması için gerekli düzenlemeler yapılmalıdır.

IX PROSEDÜR

Sağlanan malzemeler: Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

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

Test Prosedürü: Aseptik teknikleri uygulayın.

Test prosedürleri, mikobakteri içeren örneklerden birincil izolasyon için Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından önerilenlerdir.⁹ N-Asetil-L-sistin-sodyum hidroksit (NALC-NaOH) çözeltisi, hafif fakat etkili bir sindirim ve dekontaminasyon ajanı olarak tavsiye edilmektedir. Bu reaktifler, **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Dekontaminasyon Kit içerisinde sağlanmıştır. Detaylı dekontaminasyon ve kültür oluşturma talimatları için ilgili referanslara bakın.⁹⁻¹²

İnokülasyonu takiben, kapları ışık almayan bir yerde bekletin ve karbondioksit ile zenginleştirilmiş aerobik bir atmosfer sağlayan uygun bir sisteme yerleştirin. 35 ± 2 °C'de inkübe edin.

Slant ve şişelere koyulmuş besiyerleri, inokulum absorbe olana kadar yatay düzlemde inoküle edilmelidir. Tüp ve şişelerin vida kapakları gelişmenin başlaması için karbondioksitin dolaşımına izin vermek üzere ilk 3 hafta gevşek bırakılmalıdır. Sonrasında, dehidrasyonu önlemek için, kapakları sıkıştırın; haftada bir defa kısa bir süre için gevşek bırakın. Boş alan problemi yaşıyorsanız tüpleri dik konumda bırakın.

NOT: Deri lezyonlarından alınan *M. marinum* veya *M. ulcerans* olduğundan şüphelenilen kültürler, birincil izolasyon için 25 – 33 °C'de inkübe edilmelidir; *M. avium* veya *M. xenopi* içerdiğinden şüphelenilen kültürler 40 – 42 °C'de optimum gelişme gösterirler.⁹ 35 – 37 °C'de iki kültür inkübe edin.

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

Kalite Kontrolü gereksinimleri ilgili yerel, resmi ve/veya federal düzenlemelere veya akreditasyon gerekliliklerine ya da laboratuvarınızın standart Kalite Kontrol prosedürlerine uygun olarak gerçekleştirilmelidir. Kullanıcının, uygun Kalite Kontrolü uygulamaları için ilgili CLSI yönergelerine ve CLIA düzenlemelerine uyması önerilir.

X SONUÇLAR

Kültürler inokülasyondan sonra 5 ila 7 gün içerisinde ve sonrasında 8 haftaya kadar haftada bir kez okunmalıdır.

Gözlemleri Kaydedin:⁹

1. Kolonilerin makroskopik olarak görünür hale gelmesi için gerekli gün sayısı. Hızlı gelişenler 7 gün içerisinde olgun kolonilere sahip olurken; yavaş gelişenler olgun koloni oluşması için 7 günden fazla süreye ihtiyaç duyarlar.
2. Koloni sayısı (şişe):
Koloni yok = Negatif
50'den az koloni = Gerçek Sayım
50 – 100 koloni = 1+
100 – 200 koloni = 2+
Neredeyse birleşik (200 - 500) = 3+
Birleşik (500'den fazla) = 4+
3. Pigment üretimi:
Beyaz, krem veya deri rengi = Kromojenik olmayan (NC)
Limon, sarı, turuncu, kırmızı = Kromojenik (Ch)

Boyanmış smear'lar, tanımlayıcı testler gerçekleştirilmedikçe yalnızca "aside dirençli basil" olarak bildirilen aside dirençli basil gösterebilir.

Şişeler bir diseksiyon mikroskobu zemininde ters çevrilerek incelenebilir. İletilen ışık ile 10 – 60x büyütmede okuma yapın. Kolonilerin varlığı açısından 10 – 20x büyütmede hızlı tarama yapın. Koloni morfolojisini yani, serpentin lifsi kolonilerini gözlemlenmede daha yüksek büyütme (30 – 60x) faydalıdır.

XI PROSEDÜRÜN KISITLI OLDUĞU ALANLAR

Teşhis için, organizma saf kültürde bulunmalıdır. Nihai teşhis için morfolojik, biyokimyasal ve/veya serolojik testler gerçekleştirilmelidir. Detaylı bilgiler ve tavsiye edilen prosedürler için ilgili metinlere bakın.⁹⁻¹²

XII PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Piyasaya sürülmeden önce tüm Middlebrook and Cohn 7H10 Agar kabı lotları performans özellikleri açısından test edilmiştir. 0,01 mL'ye kalibre edilmiş öze kullanılarak, temsili lot örnekleri, 1 mL *Mycobacterium kansasii* Grup I (ATCC 21478), *M. scrofulaceum* Grup II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Grup III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Grup IV (ATCC 6841) ve *M. tuberculosis* (ATCC 25177) içerisinde 10^5 koloni oluşturu birim (CFU) içerecek şekilde seyreltilmiş kültürler ile sürme yöntemi kullanılarak inoküle edilir. Aşılama işleminden sonra kaplar, kapakları gevşek bir halde, %5 – 10 karbondioksitle desteklenmiş bir ortamda 35 ± 2 °C'de inkübe edilir. Kaplar, 7, 14 ve 21. günlerden sonra gelişim ve pigmentasyon açısından okunur. 21 gün içinde tüm organizmalar orta ile yoğun gelişim gösterir. Koloni pigmentasyonu şöyledir: *M. kansasii* beyaz ila kremi sarı; *M. scrofulaceum* orta sarı ila turuncu; *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* ve *M. fortuitum* krem rengindedir.

XIII TİCARİ TAKDİM ŞEKLİ

Kat. No.	Açıklama
220958	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 10'lu boyut A tüp paketi
220959	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 100'lü boyut A tüp kutusu
297448	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 10'lu boyut C tüp paketi
297396	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 100'lü boyut C tüp kutusu
297274	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, 1 oz. Şişe, 100'lü kutu

XIV REFERANSLAR

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. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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