

BD Middlebrook 7H10 Agar

ÚČEL POUŽITÍ

BD Middlebrook 7H10 Agar se používá pro izolaci a kultivaci mykobakterií.

ZÁSADY A VYSVĚTLENÍ POSTUPU

Mikrobiologická metoda

V průběhu tohoto století bylo vytvořeno značné množství médií určených ke kultivaci mykobakterií. Složení prvních médií bylo založeno na vejcích. Patřila k nim média Löwenstein-Jensen a Petragnani. Dubos a Middlebrook se podíleli na vývoji značného počtu složení s kyselinou olejovou a albuminem jako klíčovými složkami napomáhajícími růstu tuberkulózních bacilů a k ochraně organismů proti širokému spektru toxických činidel.¹ Následně se Middlebrookovi a Cohnovi povedlo složení agaru na základě kyseliny olejové a albuminu vylepšit a dosáhli rychlejší, výraznější růst druhu *Mycobacterium* na jejich specifickém médiu označeném jako 7H10.^{2,3} Oznámili, že na médiu 7H10 roste méně kontaminant než na médiích založených na vejcích běžně používaných ke kultivaci mykobakterií.⁴

Spektrum anorganických solí v **BD Middlebrook 7H10 Agar** poskytuje nezbytné látky pro růst mykobakterií. Citrát sodný po převedení na kyselinu citrónovou zachycuje určité anorganické kationty v roztoku. Glycerol je zdroj uhlíku a energie vyskytující se v médiu v nadbytku. Tuberkulózní bakterie využívají přítomnou kyselinu olejovou spolu s jinými mastnými kyselinami s dlouhými řetězci, která hraje v metabolismu mykobakterií důležitou roli. Toxické peroxidy, jež mohou být přítomny v médiu, jsou odbourávány katalázou. Primárním účinkem albuminu je ochrana tuberkulózních bacilů proti toxickým činidlům, a tudíž zlepšuje výtěžnost z primární izolace. Částečné inhibice kontaminujících bakterií se dosahuje použitím malachitové zeleně.

ČINIDLA

BD Middlebrook 7H10 Agar

Složení* na jeden litr čištěné vody

Sulfát hořčíku	0,025 g	Bovinní albumin V	5,0 g
Citronan železnato-amonný	0,04	Kataláza	0,004
Citrát sodný	0,4	Pyridoxin	0,001
Sulfát amonný	0,5	Síran zinečnatý	0,001
Glutamát sodný	0,5	Síran měďnatý	0,001
Fosfát disodný	1,5	Biotin	0,0005
Dihydrogenfosforečnan draselný	1,5	Chlorid vápenatý	0,0005
Agar	17,0	Malachitová zeleň	0,00025
Chlorid sodný	0,85	Glycerol	5,0
Glukóza	2,0	Kyselina olejová	0,05 ml

pH 6,6 ± 0,2

*Upraveno a/nebo doplněno dle potřeby tak, aby byla splněna kritéria účinnosti.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

IVD . Pouze k odbornému použití. 

Pokud misky vykazují známky mikrobiální kontaminace, změny zabarvení, vysušení, popraskání nebo jiné známky poškození, nepoužívejte je.

Pokyny pro aseptickou manipulaci, informace týkající se biologického nebezpečí a pokyny pro likvidaci použitého produktu naleznete v dokumentu **VŠEOBECNÉ POKYNY K POUŽITÍ**.

Laboratorní postupy, při nichž se pracuje s mykobakteriemi, vyžadují speciální vybavení a techniky, které minimalizují biologické nebezpečí.⁵⁻⁷ K manipulaci se vzorky a kulturami je vyžadována biologická bezpečnostní úroveň 3.

SKLADOVÁNÍ A ŽIVOTNOST

Po převzetí až do doby těsně před použitím skladujte misky v originálním pouzdru, v temnu a při teplotě 2 až 8 °C. Chraňte před mrazem a přehřátím. Misky lze inokulovat až do data expirace (viz štítek na obalu) a inkubovat po doporučenou dobu inkubace.

Misky z otevřených sad po 10 kusech lze používat po dobu jednoho týdne, pokud jsou uloženy v čistém prostředí při teplotě 2 až 8 °C.

KONTROLA KVALITY UŽIVATELEM

Inokulujte reprezentativní vzorky následujícími kmeny (podrobné informace naleznete v dokumentu **VŠEOBECNÉ POKYNY K POUŽITÍ**). Inkubujte misky při 35 ± 2 °C aerobně nebo v aerobním prostředí obohaceném oxidem uhličitým.

Kmen	Inkubace	Výsledek
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	2 až 3 týdny	Růst dobrý až vynikající
<i>Mycobacterium fortuitum</i> DSM 46621	2 až 3 týdny	Růst dobrý až vynikající
<i>Mycobacterium smegmatis</i> DSM 43061	2 až 5 dnů	Růst dobrý až vynikající
<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	2 až 3 týdny	Uspokojivý až vynikající růst
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2 až 5 dnů	Inhibován
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2 až 5 dnů	Inhibován
Slepý vzorek	Jantarová, velice jemně nazelenalý odstín	

POSTUP

Dodaný materiál

BD Middlebrook 7H10 Agar (misky **Stacker** o velikosti 90 mm). Mikrobiologicky kontrolováno.

Materiál, který není součástí dodávky

Pomocná kultivační média, činidla a laboratorní vybavení dle potřeby.

Typy vzorků

Médium se používá k izolaci a kultivaci mykobakterií z klinických vzorků a lze jej také použít ke kultivaci mykobakterií ve speciálních testech (např. při testování dezinfekčních prostředků proti mykobakteriím).

Detaily o vhodných vzorcích naleznete v referencích.⁶⁻¹⁰

Provedení testu

Testové postupy odpovídají postupům doporučovaným centry kontroly onemocnění a prevence (CDC) k primární izolaci vzorků obsahujících mykobakterie. Jako mírný, ale účinný prostředek k digesci a dekontaminaci se doporučuje roztok N-acetyl-L-cystein-hydroxidu sodného (NALC-NaOH). Podrobné pokyny pro dekontaminaci a kultivaci naleznete v referencích.⁴⁻¹⁰

Po inokulaci ponechte misky kryté před světlem a umístěte je médiem otočené směrem dolů do nádoby systému **BD GasPak** pracující v kombinaci s jednorázovou obálkou **GasPak** generátoru oxidu uhličitého nebo jiným systémem poskytujícím aerobní prostředí obohacené oxidem uhličitým. Inkubujte při teplotě 35 ± 2 °C. Zabraňte vyschnutí média při inkubaci.

Poznámka: Kultury z kožních lézí a lézí měkké tkáně podezřelé, že obsahují *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. chelonae* nebo jiné druhy s nízkou optimální teplotou, je nutné inkubovat při 25 až 33 °C. Inkubujte duplikátní kulturu při 35 až 37 °C.^{5,9}

Výsledky

Během 5 až 7 dní po inokulaci zkontrolujte misky a totéž poté provádějte jednou týdně po dobu až 8 týdnů. Další podrobnosti o morfologii kolonií a pigmentaci naleznete v referencích.⁶⁻¹⁰

Při čtení misek obraťte misky na stojanu mikroskopu. Odečítejte při zvětšení 10 – 60x s přenášeným světlem. Rychle prohlédněte při zvětšení 10 – 20x na přítomnost kolonií. Větší zvětšení (30 – 60x) je užitečné při sledování morfologie kolonií, tj. vlnité provazcovité kolonie.

Zaznamenejte následující údaje: ^{5,6}

1. Počet dní nutných k tomu, aby se kolonie staly makroskopicky viditelné.
2. Počet kolonií:

Bez kolonií = negativní

Méně než 50 kolonií = zaznamenejte skutečný počet

50 – 100 kolonií = 1+

100 – 200 kolonií = 2+

Téměř slévající se vrstva (200 – 500) = 3+

Slévající se vrstva (více než 500) = 4+

3. Produkce pigmentu

Bílé, krémové nebo žlutohnědé = nechromogenní (NC)

Citronové, žluté, oranžové, červené = chromogenní (Ch)

Obarvené kmeny mohou ukazovat acidorezistentní bacily, které jsou hlášeny pouze jako „acidorezistentní bacily“, dokud nejsou provedeny definitivní testy. Informace o dalších diferenčních testech a postupech úplné identifikace izolovaných organismů naleznete v příslušných odkazech. ^{4–10}

SPECIFICKÉ VLASTNOSTI ÚČINNOSTI A OMEZENÍ POSTUPU

BD Middlebrook 7H10 Agar je jedním ze standardních agarových médií používaných k izolaci a kultivaci mykobakterií z klinických vzorků. ^{4,6,7–11}

Jelikož je médium pouze částečně selektivní, mohou na něm růst jiné bakterie než mykobakterie, pokud se vzorky předem příslušným způsobem neošetří a nedekontaminují. ^{6,7,9,10}

Negativní kultivace nevylučuje aktivní infekci mykobakterií. Doporučuje se naočkovat několik médií s různým složením (pevná a tekutá). ^{6–10}

REFERENCE

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, W.E. 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. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
6. Sommers, H.M., and J.K. McClatchy. 1983. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., J.A. Morello. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Küchler, R., et al. 1998. Tuberkulose - Mycobacteriose. *In: Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gatermann (ed.). MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*, vol. 5. Urban & Fischer, Munich, Germany.
8. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
9. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. DIN 58943. 1996. Diagnosis of tuberculosis. Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods. Beuth Verlag, Berlin.
11. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost, Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

BALENÍ/DOSTUPNOST

BD Middlebrook 7H10 Agar

Kat. č. 254520

Médium na miskách k okamžitému použití, 20 kusů v balení

Kat. č. 254521

Médium na miskách k okamžitému použití, 120 kusů v balení

DALŠÍ INFORMACE

Další informace vám poskytne místní zástupce společnosti BD.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD