

PROCEDURI PENTRU CONTROLUL DE CALITATE (Opțional)**I INTRODUCERE**

BD BBL™ Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (Bulion BD BBL™ Middlebrook 7H9 cu glicerol) este un mediu de cultură neselectiv pentru cultivarea micobacteriilor.

II PROCEDURA TESTULUI DE PERFORMANȚĂ**A. Procedura de preparare a inoculilor**

1. Inoculați mediile înclinate Lowenstein-Jensen cu tulpini micobacteriene relevante provenite din stocurile de cultură, utilizând aplicatoare sterile.
2. Incubați flacoanele cu capacele slăbite, la $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ în atmosferă aerobă suplimentată cu dioxid de carbon (5–10%), până la obținerea unei creșteri substanțiale (de obicei în 2 până la 3 săptămâni).
3. Recoltați coloniile cu un aplicator ascuțit steril prin îndepărtarea blândă a celulelor de pe suprafața mediului, fără a preleva și mediu de cultură.
 - a. Pentru *Mycobacterium tuberculosis* ATCC® 25177:
 - (1) Transferați coloniile recoltate într-un flacon de sticlă steril cu capac cu filet și perle de sticlă sterile conținând 5,0 ml bulion Middlebrook 7H9 cu glicerol.
 - (2) Amestecați bine prin rotire (câteva minute) până când suspensia nu mai conține aglomerări mari.
 - (3) Comparați această suspensie cu standardul nefelometric McFarland #1. Turbiditatea suspensiei trebuie să fie mai mare decât a standardului.
 - (4) Lăsați flaconul într-un stativ timp de 2 până la 3 h la temperatura camerei pentru a permite sedimentarea particulelor mari.
 - (5) Transferați supernatantul într-un recipient steril.
 - (6) Ajustați turbiditatea suspensiei la standardul McFarland #1 (10^8 UFC/ml) prin adăugarea lentă de bulion steril Middlebrook 7H9 cu glicerol. Agitați bine.
 - (7) Înainte de utilizare diluați până la 10^5 UFC/ml. Amestecați bine și inoculați mediul de testare cu o ansă calibrată de 0,01 ml.
 - b. Pentru toate celelalte tulpini de micobacterii:
 - (1) Transferați coloniile recoltate într-un flacon steril de 50 ml pentru centrifugare, cu capac cu filet și cu 8 până la 12 perle de sticlă sterile (cu diametru de 2 mm) conținând 5 ml de diluant pentru micobacterii preparat astfel:
 - Amestecați următoarele ingrediente într-un balon de 1 l și ajustați pH-ul, utilizând hidroxid de sodiu 1N, până la valori între 6,7 și 7,0:
Albumină bovină (fără acizi grași).....1,0 g
Polisorbat 80.....0,1 ml
Apă purificată.....500 ml
 - Sterilizați prin filtrare membranară (filtru de 0,2 μ)
 - Repartizați aseptice câte 5,5 ml în flacoane pentru centrifugă sterile, cu capace cu filet.
 - (2) Emulsionați coloniile micobacteriene cu aplicatorul pe peretele lateral al tubului de centrifugare cu capac cu filet. Amestecați coloniile cu diluant.
 - (3) Astupați flaconul și amestecați prin rotire timp de aproximativ 10 min până la obținerea unei suspensii fără aglomerări mari.
 - (4) Adăugați 15 ml de diluant steril pentru micobacterii și amestecați bine.
 - (5) Comparați această suspensie cu standardul nefelometric McFarland #1. Turbiditatea suspensiei trebuie să fie mai mare decât a standardului.
 - (6) Lăsați flaconul într-un stativ timp de 2 până la 3 h la temperatura camerei pentru a permite sedimentarea particulelor mari.
 - (7) Aspirați supernatantul și transferați-l într-un recipient steril. Suspensia trebuie să aibă o turbiditate mai mare decât standardul McFarland #1 și să nu conțină particule mari. În cazul prezenței unor particule mari, amestecați și lăsați pentru încă 1 h. Transferați supernatantul într-un recipient steril.
 - (8) Ajustați turbiditatea suspensiei la standardul McFarland #1 (10^8 UFC/ml) prin adăugarea lentă de diluant steril pentru micobacterii. Agitați bine.
 - (9) Distribuiți alicote din suspensie în fiole pentru congelare etichetate cu identitatea microorganismului și data preparării.
 - (10) Congelați suspensiile din fiole prin introducerea acestora într-un congelator pentru temperaturi scăzute la $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fiolele pot fi păstrate până la 6 luni.
 - (11) În scopul utilizării, scoateți fiolele din congelator și dezghețați conținutul rapid prin introducerea flacoanelor în băi de apă la $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ până la $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Înainte de utilizare diluați până la 10^5 UFC/ml. Amestecați bine și inoculați mediul de testare cu o ansă calibrată de 0,01 ml.

B. Procedura pentru mediul de testare

1. Inoculați eșantioane reprezentative în culturile enumerate mai jos.
 - a. Cu anse sterile de unică folosință, calibrate la 0,01 ml, inoculați flacoanele utilizând culturile micobacteriene preparate așa cum este descris mai sus.
 - b. Incubați flacoanele cu capacele slăbite la $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ în atmosferă aerobă suplimentată cu dioxid de carbon.
2. Examinați flacoanele la 7, 14 și, dacă este necesar, la 21 zile în vederea evaluării creșterii și pigmentării.
3. Rezultate estimate.

Organisme CLSI	ATCC	Recuperare
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Creștere
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , Grup I	12478	Creștere
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , Grup II	19981	Creștere
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , Grup III	13950	Creștere
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , Grup IV	6841	Creștere

*Tulpină recomandată pentru controlul calității efectuat de utilizator.

III CONTROLUL SUPLIMENTAR DE CALITATE

1. Examinați eprubetele așa cum este descris în „Deteriorarea produsului”.
2. Examinați vizual eprubetele reprezentative, pentru a vă asigura că eventualele defecte fizice nu împiedică utilizarea.
3. Incubați eprubetele reprezentative neinoculate în condiții de aerobioză, la 20 °C–25 °C și 30 °C–35 °C și examinați-le după 7 zile pentru a detecta contaminarea microbiană.

INFORMAȚII DESPRE PRODUS

IV UTILIZARE SPECIFICĂ

Bulionul **BD BBL Middlebrook 7H9** cu glicerol este un mediu suplimentat care susține creșterea micobacteriilor, inclusiv *M. tuberculosis*. Produsul este utilizat, în principal, la creșterea de culturi pure de micobacterii, pentru a fi folosite în cadrul studiilor de laborator.

V REZUMAT ȘI EXPLICAȚII

Middlebrook și colaboratorii săi au dezvoltat formula bazei de bulion 7H9 aproximativ în aceeași perioadă în care au conceput baza de agar 7H10.¹⁻³ Ambele tipuri de medii susțin creșterea speciilor de micobacterii atunci când sunt suplimentate cu substanțe nutritive precum glicerol, acid oleic, albumină și dextroză, cu excepția *M. bovis*, care este inhibată de glicerol.

Acest mediu este utilizat la prepararea inoculilor pentru analize antimicrobiene, ca mediu de bază pentru teste biochimice și pentru subcultura stocurilor de tulpini.

VI PRINCIPIILE PROCEDURII

Cantitatea ridicată de săruri anorganice din acest mediu asigură substanțele esențiale pentru creșterea micobacteriilor. Citratul de sodiu, atunci când este transformat în acid citric, ajută la menținerea anumitor cationi anorganici în soluție. Clorura de sodiu, albumina bovină, dextroza și catalaza sunt componente ale agentului de îmbogățire Middlebrook ADC. Albumina acționează ca un agent protector prin legarea acizilor grași liberi, care pot fi toxici pentru unele specii de *micobacterii*. Catalaza distruge peroxidii toxici ce ar putea fi prezenți în mediu. Dextroza este o sursă de energie. Clorura de sodiu asigură electroliții esențiali. Suplimentarea cu glicerol favorizează creșterea micobacteriilor.

VII REACTIVI

Bulion BD BBL Middlebrook 7H9

Formulă aproximativă* pentru un litru de apă purificată

Fosfat de monopotasiu	2,0 g	Citrat de fier și amoniu	0,04 g
Fosfat disodic	1,5 g	Sulfat de magneziu	0,05 g
Glutamat monosodic	0,5 g	Sulfat de zinc	0,001 g
Citrat de sodiu	0,1 g	Sulfat de cupru	0,001 g
Sulfat de amoniu	0,5 g	Biotină	0,5 mg
Piridoxină	0,001 g	Clorură de calciu	0,5 mg

*Ajustată și/sau suplimentată după cum este necesar, pentru a îndeplini criteriile de performanță.

Mediul complet, în flacoanele preparate, conține, pe lângă ingredientele enumerate mai sus, per litru, 2 ml de glicerol și componentele agentului de îmbogățire ADC, și anume:

Clorură de sodiu	0,85 g
Albumină bovină (fracție V)	5,0 g
Dextroză	2,0 g
Catalază	4,0 mg
Piruvat de sodiu	1,0 g

Avertismente și precauții: În scopul diagnosticului *in vitro*.

Eprubetele cu capace bine fixate trebuie deschise cu atenție, pentru a evita rănirea ca urmare a spargerii sticlei.

Practicile și procedurile conforme nivelului 2 de siguranță biologică, echipamentul și facilitățile de izolare sunt necesare în timpul manipularilor care nu produc aerosoli ale probelor clinice, precum prepararea frotiurilor acido-rezistente. Toate activitățile producătoare de aerosoli trebuie realizate într-o boxă pentru siguranță biologică de clasă I sau II. Tehnici de siguranță biologică de nivel 3, echipament și dispozitive de siguranță sunt necesare activităților de laborator ce implică propagarea și manipularea culturilor de *M. tuberculosis* și *M. bovis*. De asemenea, studiile animale necesită proceduri speciale.⁴

În timpul tuturor procedurilor, respectați tehnicile de asepzie și precauțiile stabilite împotriva riscurilor microbiologice. Flacoanele preparate, recipientele pentru probe și celelalte materiale contaminate trebuie sterilizate prin autoclavare după utilizare, înainte de a fi aruncate.

Instrucțiuni de depozitare: La recepție, depozitați flacoanele la întuneric, la 2–8 °C. Evitați congelarea și supraîncălzirea. Deschideți numai înainte de utilizare. Reduceți la minimum expunerea la lumină. Mediile ambalate în eprubete păstrate până la utilizare în condițiile specificate pe etichetă pot fi inoculate până la data de expirare și incubate pentru duratele recomandate de incubare, de până la maximum 8 săptămâni pentru mediile de micobacteriologie. Lăsați mediul să ajungă la temperatura camerei înainte de inoculare.

Deteriorarea produsului: Nu utilizați eprubetele dacă prezintă semne de contaminare microbiană, decolorare, deshidratare sau alte semne de deteriorare.

VIII COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBELOR

Problele adecvate pentru cultivare pot fi manevrate utilizând tehnici variate. Pentru informații detaliate consultați textele corespunzătoare.^{5,6} Probele trebuie obținute înainte de administrarea agenților antimicrobieni. Trebuie să se asigure livrarea promptă la laborator.

IX PROCEDURĂ

Materiale furnizate: Bulion **BD BBL** Middlebrook 7H9 cu glicerol

Materiale necesare, dar nefurnizate: Medii de cultură auxiliare, reactivi, organisme pentru controlul de calitate și echipamentul de laborator necesar.

Procedura de testare: Respectați tehnicile de asepse.

Ulterior inoculării, păstrați flacoanele într-un sistem adecvat care să furnizeze o atmosferă aerobă, îmbogățită cu dioxid de carbon în proporție de 5–10%. Incubați la 35 °C ± 2 °C timp de maximum 8 săptămâni. În primele 3 săptămâni flacoanele trebuie să aibă capacele slăbite pentru a permite circulația dioxidului de carbon în vederea inițierii creșterii. Ulterior, strângeți capacele pentru a preveni deshidratarea; slăbiți-le pentru perioade scurte o dată pe săptămână.

Controlul calității efectuat de utilizator: Consultați „Proceduri pentru controlul de calitate”.

Fiecare lot de medii a fost testat prin utilizarea de organisme corespunzătoare pentru controlul de calitate, această testare îndeplinind cerințele din specificațiile produsului și standardele CLSI, în măsura în care acestea sunt relevante. La fel ca întotdeauna, testarea de control al calității trebuie efectuată conform reglementărilor în vigoare la nivel local, statal, federal sau național, conform cerințelor de acreditare și/sau procedurilor de laborator standard pentru controlul de calitate.

X REZULTATE

Culturile trebuie interpretate în 5 până la 7 zile de la inoculare și în continuare săptămânal timp de până la 8 săptămâni. Coloniile micobacteriene din tuburile cu bulion pot fi utilizate pentru proceduri suplimentare de testare în laborator, după cum este necesar.

XI LIMITĂRILE PROCEDURII

Pentru a fi identificate, microorganismele trebuie să provină din culturi pure. Pentru identificarea finală trebuie efectuate teste morfologice, biochimice și/sau serologice. Pentru informații detaliate și proceduri recomandate, consultați textele corespunzătoare.⁵⁻⁷

XII CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ

Înainte de scoaterea pe piață, toate loturile de Bulion Middlebrook 7H9 cu glicerol sunt testate în ceea ce privește caracteristicile de performanță. Utilizând o ansă calibrată de 0,01 ml, eșantioanele reprezentative ale lotului sunt inoculate cu următoarele culturi diluate astfel încât să conțină 10³ unități formatoare de colonii (UFC) la fiecare 0,01 ml de *Mycobacterium kansasii* Grup I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Grup II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Grup III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Grup IV (ATCC 6841) și *M. tuberculosis* (ATCC 25177). După inoculare, flacoanele sunt incubate cu capacele slăbite, la 35 °C ± 2 °C în atmosferă suplimentată cu dioxid de carbon în proporție de 5-10%. Flacoanele sunt interpretate în ceea ce privește creșterea după o incubare de 7, 14 și 21 de zile. Toate organismele prezintă o creștere moderată spre puternică după 21 zile.

XIII DISPONIBILITATE

Nr. cat.	Descriere
221832	Bulion BD BBL™ Middlebrook 7H9 cu glicerol, 5 ml

XIV REFERINȚE

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.

Service Tehnic și Suport: Contactați reprezentantul local BD sau bd.com.



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.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.