BD Middlebrook 7H10 Agar

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BD Middlebrook 7H10 Agar** é utilizado para o isolamento e cultivo de micobactérias.

PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Método microbiológico.

Ao longo deste século, têm sido criados muitos meios de cultura para micobactérias. Os primeiros meios consistiam em formulações à base de ovo e incluíam o Meio Lowenstein-Jensen e o Meio Petragnani. 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 agar 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]

O **BD Middlebrook 7H10 Agar** contém vários sais inorgânicos que fornecem substâncias essenciais para o crescimento de micobactérias. O citrato de sódio, quando convertido em 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. A catalase destrói os peróxidos tóxicos que possam estar presentes no meio. O principal efeito da albumina é a protecção dos bacilos da tuberculose contra agentes tóxicos, aumentando assim a sua recuperação no isolamento primário. A inibição parcial de bactérias contaminantes é conseguida pela presença do corante verde malaquite.

REAGENTES

BD Middlebrook 7H10 Agar

Fórmula* por Litro de Água Purificada

Sulfato de magnésio	0,025 g	Albumina bovina V	5,0 g
Citrato de amónia férrico	0,04	Catalase	0,004
Citrato de sódio	0,4	Piridoxina	0,001
Sulfato de amónio	0,5	Sulfato de zinco	0,001
Glutamato monossódico	0,5	Sulfato de cobre	0,001
Fosfato dissódico	1,5	Biotina	0,0005
Fosfato monopotássico	1,5	Cloreto de cálcio	0,0005
Agar	17,0	Verde malaquite	0,00025
Cloreto de sódio	0,85	Glicerol	5,0
Glucose	2,0	Ácido oleico	0,05 mL

pH 6,6 ± 0,2

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

PRECAUÇÕES

IVD . Apenas para uso profissional.

Não utilizar as placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secura, fissuras ou outros sinais de deterioração.

Consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO** para informação sobre os procedimentos de manuseamento asséptico, os riscos biológicos e os procedimentos de eliminação do produto usado.
Os procedimentos laboratoriais que envolvem micobactérias exigem equipamento e técnicas especiais para minimizar os riscos biológicos.[5-7] O Nível 3 de Biossegurança é necessário para o manuseamento de amostras e culturas.

ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Após recepção das placas, conservar no escuro a uma temperatura entre 2 e 8°C, dentro do invólucro original até ao momento da utilização. Evitar congelar e aquecer excessivamente. As placas podem ser inoculadas até ao prazo de validade (ver a etiqueta da embalagem) e incubadas durante o tempo de incubação recomendado.
As placas são fornecidas em pilhas de 10 placas e, quando uma destas pilhas é aberta, as respectivas placas terão de ser utilizadas no prazo máximo de uma semana, se forem conservadas em local limpo a uma temperatura entre 2 e 8°C.

CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

Inocular amostras representativas com as seguintes estirpes (para mais detalhes, consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO**). Incubar a 35 ± 2°C em condições aeróbias ou numa atmosfera aeróbia suplementada com dióxido de carbono.

Estirpe	**Incubação**	**Resultado**
Mycobacterium tuberculosis H37Ra ATCC 25177	2 a 3 semanas	Crescimento bom a excelente
Mycobacterium fortuitum DSM 46621	2 a 3 semanas	Crescimento bom a excelente
Mycobacterium smegmatis DSM 43061	2 a 5 dias	Crescimento bom a excelente
Mycobacterium terrae ATCC 15755	2 a 3 semanas	Crescimento razoável a excelente
Staphylococcus aureus ATCC 25923	2 a 5 dias	Inibido
Escherichia coli ATCC 25922	2 a 5 dias	Inibido
Não inoculadas	Âmbar, tonalidade esverdeada muito ligeiramente	

PROCEDIMENTO

Materiais fornecidos

BD Middlebrook 7H10 Agar (placas **Stacker** de 90 mm). Microbiologicamente controlado.

Materiais não fornecidos

Meios de cultura auxiliares, reagentes e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Tipos de amostra

Trata-se de um meio utilizado para o isolamento e cultivo de micobactérias provenientes de amostras clínicas, podendo também ser utilizado para o cultivo de micobactérias em testes especiais (por exemplo, para o testar a acção dos desinfectantes contra as micobactérias). Para mais detalhes sobre as amostras adequadas, consultar a bibliografia.[6-10]

Procedimento do teste

Os procedimentos de teste são os recomendados pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para o isolamento primário de espécies que contenham micobactérias. É recomendada uma solução de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio (NALC-NaOH) como agente de digestão e descontaminação suave, mas eficaz. Para instruções mais detalhadas sobre os métodos de cultivo e descontaminação consultar a bibliografia.[4-10]
Após a inoculação, manter as placas protegidas da luz e colocá-las, com o lado do meio virado para baixo, num frasco de **BD GasPak** equipado com um envelope gerador de dióxido de carbono descartável **GasPak** ou noutro sistema adequado para fornecimento de uma atmosfera aeróbia enriquecida com dióxido de carbono. Incubar a 35 ± 2°C. Evitar a dessecação do meio durante a incubação.

Nota: As culturas efectuadas a partir de lesões cutâneas ou no tecido mole em que há suspeita de conterem *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum, M. chelonae* ou outras espécies com um valor óptimo de temperatura inferior devem ser incubadas a uma temperatura entre 25 e 33°C. Incubar uma cultura duplicada a uma temperatura entre 35 e 37°C.[5,9]

Resultados

As placas podem 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. Para mais detalhes sobre a morfologia e pigmentação das colónias, consultar a bibliografia.[6-10]

Para proceder à leitura das placas, inverte-las sobre a plataforma de um microscópio de dessecação. Ler com uma ampliação de 10-60x com a luz transmitida. Ler rapidamente a 10-20x para verificar a presença de colónias. Uma ampliação superior (30-60x) ajuda a observar a morfologia das colónias, ou seja, colónias tipo fio de serpentina.

Registar as seguintes observações:[5,6]

1. Número de dias necessário para as colónias se tornarem macroscopicamente visíveis.
2. Número de colónias:
   - Sem colónias = Negativo
   - Inferior a 50 colónias = Registar a contagem real
   - 50 a 100 colónias = 1+
   - 100 a 200 colónias = 2+
   - Quase confluentes (200 a 500) = 3+
   - Confluentes (mais de 500) = 4+
3. Produção de pigmentos
   - Branco, creme ou amarelo-claro = Não cromogénio (NC)
   - Amarelo-limão, amarelo, cor-de-laranja, vermelho = Cromogénio (Ch)

Os esfregaços colorados irão apresentar bacilos ácido-resistentes, que são referidos apenas como "bacilos ácido-resistentes", a não ser que sejam efectuados testes definitivos. Consultar a bibliografia apropriada para informação sobre outros testes de diferenciação e sobre os procedimentos para obter uma identificação completa dos organismos isolados.[4-10]

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O **BD Middlebrook 7H10 Agar** é um dos meios de agar padrão utilizados para o isolamento e cultivo de micobactérias provenientes de amostras clínicas.[4,6,7-11]

Uma vez que este meio só é parcialmente selectivo, poderá verificar-se o crescimento de outras bactérias que não as micobactérias, caso as amostras não sejam previamente tratadas de forma apropriada em relação à descontaminação.[6,7,9,10]

As culturas negativas não excluem uma infecção activa por micobactérias. Em termos de boas práticas, dever-se-á proceder à inoculação de formulações de meios diferentes (sólidos e líquidos).[6-10]

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, 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 charcteristics, isolation, and staining procedures. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (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. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

EMBALAGEM/ APRESENTAÇÃO

BD Middlebrook 7H10Agar

No. de cat. 254520	Meios em placas prontos a usar, 20 placas
No. de cat. 254521	Meios em placas prontos a usar, 120 placas

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para obter informações adicionais, contacte o representante local da 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 the property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD