BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

L007467 • Rev. 12 • ottobre 2015

PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ (Facoltativo)

I INTRODUZIONE

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol è un terreno di coltura non selettivo per la coltivazione di micobatteri.

II PROCEDURA DEL TEST

A. Procedura per la preparazione degli inoculi

1. Inoculare gli slant di Lowenstein-Jensen Medium con colture in stock dei ceppi micobatterici pertinenti utilizzando applicatori a bastoncino sterili per inoculazione.
2. Incubare a 35 ± 2 °C le provette con i tappi non completamente avvitati in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica (5-10%), fino ad ottenere una crescita sostenuta (di solito entro 2 o 3 settimane).
3. Raccogliere la crescita con un applicatore a bastoncino sterile e affilato, rimuovendo delicatamente le cellule dalla superficie del terreno e facendo attenzione a non prelevare con le cellule anche il terreno di coltura.
   a. Per *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
      (1) Trasferire la crescita su 5,0 mL di brodo Middlebrook 7H9 con glicerolo in una provetta sterile di vetro con tappo a vite contenente microsfere di vetro sterili.
      (2) Vortexare accuratamente (diversi minuti) finché la sospensione non risulta priva di grossi grumi.
      (3) Paragonare tale sospensione allo standard del nefelometro di McFarland n.1. La sospensione dovrà essere più torbida dello standard.
      (4) Posizionare la provetta in un portaprovette per 2 o 3 h a temperatura ambiente in modo da far depositare sul fondo le particelle grandi.
      (5) Trasferire il sovranatante in un contenitore sterile.
      (6) Regolare la torbidità della sospensione allo standard McFarland n. 1 (10^8 UFC/mL) aggiungendo lentamente il brodo sterile Middlebrook 7H9 con glicerolo. Mescolare accuratamente.
      (7) Prima di utilizzare, diluire a 10^5 UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare il terreno per test utilizzando un'ansa calibrata da 0,01 mL.
   b. Per tutti gli altri ceppi micobatterici, procedere come segue.
      (1) Trasferire la crescita in una provetta da centrifuga sterile con tappo a vite da 50 mL contenente da 8 a 12 microsfere di vetro sterili (diametro 2 mm) e 5 mL di Mycobacterium Diluent preparato come segue.
         - Mescolare i seguenti ingredienti in un matraccio da 1 L e regolare il pH, utilizzando idrossido di sodio, a 6,7 – 7,0

Albumina bovina (priva di acidi grassi)	1,0	g
Polisorbato 80	0,1	mL
Acqua purificata	500	mL

         - Sterilizzare con filtrazione a membrana (filtro da 0,2 µ)
         - Dispensare asetticamente in provette da centrifuga sterili piccole con tappo a vite, in aliquote di 5,5 mL.
      (2) Emulsificare la crescita micobatterica sulla parete laterale di una provetta da centrifuga con tappo a vite utilizzando un applicatore a bastoncino. Mescolare la crescita con il diluente.
      (3) Tappare la provetta e vortexare per 10 min circa, finché la crescita non risulta ben sospesa e priva di grossi grumi.
      (4) Aggiungere 15 mL di Mycobacterium Diluent e mescolare accuratamente.
      (5) Paragonare tale sospensione allo standard del nefelometro di McFarland n.1. La sospensione dovrà essere più torbida dello standard.
      (6) Posizionare la provetta in un portaprovette per 2 o 3 h a temperatura ambiente in modo da far depositare sul fondo le particelle grandi.

(7) Aspirare il sovranatante e trasferirlo in un contenitore sterile. La sospensione deve presentarsi più torbida dello standard McFarland #1 e priva di particelle di grandi dimensioni. Nel caso in cui siano presenti ancora particelle di grandi dimensioni, mescolare e lasciar depositare ancora per 1 h. Trasferire il sovranatante in un contenitore sterile.
(8) Regolare la torbidità della sospensione allo standard McFarland n. 1 (10^8 UFC/mL) aggiungendo lentamente Mycobacterium Diluent. Mescolare accuratamente.
(9) Dispensare le aliquote di sospensione in flaconi da congelatore con etichetta adatta riportare l'identificazione del microrganismo e la data di preparazione.
(10) Congelare le sospensioni posizionando i flaconi in un congelatore a bassa temperatura a -60 °C. I flaconi possono essere conservati per un massimo di 6 mesi.
(11) Per l'utilizzo, prelevare i flaconi congelati e scongelare rapidamente il contenuto mettendo la provetta a bagnomaria a 30 – 35 °C. Prima di utilizzare, diluire a 10^5 UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare il terreno per test utilizzando un'ansa calibrata da 0,01 mL.

B. Procedura per testare il terreno

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
   a. Utilizzando anse calibrate sterili monouso da 0,01 mL, inoculare le provette con colture preparate nel modo descritto sopra.
   b. Incubare a 35 ± 2 °C le provette con i tappi non completamente avvitati, in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica.
2. Esaminare la crescita e la pigmentazione nelle provette dopo 7, 14 e – se necessario – 21 giorni.
3. Risultati attesi

Microrganismi di controllo CLSI

**Mycobacterium tuberculosis* ..... Crescita
H37Ra ATCC 25177
**Mycobacterium kansasii,* ..... Crescita
Gruppo I ATCC 12478
**Mycobacterium scrofulaceum,*..... Crescita
Gruppo II ATCC 19981
**Mycobacterium intracellulare,*..... Crescita
Gruppo III ATCC 13950
**Mycobacterium fortuitum,* ..... Crescita
Gruppo IV ATCC 6841

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Incubare in aerobiosi a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol è un terreno di coltura arricchito che sostiene la crescita dei micobatteri, tra cui *M. tuberculosis*. Viene impiegato principalmente per la crescita di colture pure di micobatteri da utilizzare in studi di laboratorio.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Middlebrook ed i suoi collaboratori hanno sviluppato la formulazione base del brodo 7H9 nello stesso periodo in cui hanno formulato la base agar 7H10.[1-3] Entrambe le tipologie di terreno si prestano a sostenere la crescita di specie micobatteriche, se arricchite con principi nutritivi come glicerolo, acido oleico, albumina e destrosio, eccetto *M. bovis* che viene inibito dal glicerolo.

Questo terreno viene utilizzato nella preparazione degli inoculi per le prove antimicrobiche, come terreno di base per test biochimici e per subcolture di ceppi in stock.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La presenza in questo terreno di una grande varietà di sali inorganici garantisce l'apporto di sostanze essenziali per la crescita dei micobatteri. Il citrato di sodio, convertito in acido citrico, serve a mantenere in soluzione determinati cationi inorganici. Il cloruro di sodio, l'albumina bovina, il destrosio e la catalasi sono componenti del Middlebrook ADC Enrichment. L'albumina agisce come agente protettivo legando gli acidi grassi liberi, che potrebbero risultare tossici per le specie *Mycobacterium*. La catalasi distrugge i perossidi tossici eventualmente presenti nel terreno. Il destrosio è una fonte di energia. Il cloruro di sodio fornisce gli elettroliti essenziali. Il supplemento di glicerolo migliora la crescita dei micobatteri.

VII REAGENTI

Brodo Middlebrook 7H9

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Fosfato monopotassico	2,0	g
Fosfato disodico	1,5	g
Glutammato monosodico	0,5	g
Citrato di sodio	0,1	g
Solfato di ammonio	0,5	g
Piridossina	0,001	g
Citrato di ammonio ferrico	0,04	g
Solfato di magnesio	0,05	g
Solfato di zinco	0,001	g
Solfato di rame	0,001	g
Biotina	0,5	mg
Cloruro di calcio	0,5	mg

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

In aggiunta agli ingredienti sopra elencati, il terreno completo in provette preparate , contiene, per ogni litro, 2 mL di glicerolo ed i seguenti componenti dell'arricchimento ADC.

Cloruro di sodio	0,85	g
Albumina bovina (Frazione V)	5,0	g
Destrosio	2,0	g
Catalasi	4,0	mg
Piruvato di sodio	1,0	g

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

Per le manipolazioni di campioni clinici (es. preparazione di strisci acido-resistenti) che non comportano produzione di aerosol, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 2. Tutte le procedure che comportano la generazione di aerosol devono essere eseguite sotto cappa di sicurezza biologica di Classe I o II. Per le attività di laboratorio che comportano la propagazione e manipolazione di colture di *M. tuberculosis* and *M. bovis*, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 3. Anche gli studi su animali richiedono procedure speciali.[4]

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso, le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare di congelare e surriscaldare. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per la durata raccomandata (fino a 8 settimane per

i terreni di micobatteriologia). Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto
Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni specifiche, consultare la documentazione appropriata.[5,6] Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito
Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

Materiali necessari ma non forniti
Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test
Adottare tecniche asettiche.

Dopo l'inoculazione, posizionare le provette in un sistema adatto in presenza di atmosfera aerobica arricchita di anidride carbonica al 5-10%. Incubare a 35 ± 2 °C per un massimo di 8 settimane. Per le prime 3 settimane non serrare completamente i tappi delle provette per consentire la circolazione di anidride carbonica per la crescita iniziale. Successivamente, serrare i tappi per evitare la disidratazione e allentarli per un breve periodo una volta alla settimana.

Controllo di qualità a cura dell'utente
Vedere "Procedure di Controllo di qualità".

Ciascun lotto di terreno è stato testato utilizzando organismi per il controllo di qualità appropriati, e tali test soddisfano le specifiche di prodotto e gli standard CLSI, ove opportuno. Come di consueto, i test di controllo qualità devono essere eseguiti in ottemperanza alle normative locali, statali, federali o nazionali vigenti, nonché ai requisiti di certificazione e/o alle procedure standard di controllo di qualità del laboratorio specifico.

X RISULTATI

I risultati delle colture dovranno essere letti entro 5 – 7 settimane dall'inoculo e successivamente una volta alla settimana per un massimo di 8 settimane. La crescita micobatterica delle provette di brodo può essere utilizzata per procedure di prove di laboratorio supplementari, se necessario.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici.
Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.[5-7]

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol. Utilizzando un'ansa calibrata da 0,01 mL, vengono inoculati campioni rappresentativi del lotto con colture diluite fino a contenere 10^3 di unità formanti colonie (UFC) per 0,01 mL di *Mycobacterium kansasii* Gruppo I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Gruppo II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Gruppo III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Gruppo IV (ATCC 6841) e *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Dopo l'inoculazione, le provette vengono incubate a 35 ±2°C con i tappi non completamente serrati, in atmosfera arricchita con il 5 – 10% di anidride carbonica. I risultati della crescita nelle provette vengono letti dopo un'incubazione di 7, 14 e 21 giorni. Tutti i microrganismi evidenziano una crescita da moderata a sostenuta entro 21 giorni.

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
221832	**BD BBL** Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 mL

XIV BIBLIOGRAFIA

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. Yolken (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.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com/ds.

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA

EC REP 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