

POSTUPY KONTROLY KVALITY (Nepovinné údaje)**I ÚVOD**

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol je neselektivní kultivační médium určené pro kultivaci mykobakterií.

II POSTUPY TESTU ÚČINNOSTI**A. Postup pro přípravu inokula**

1. Naočkejte šikmé Lowenstein-Jensenovo médium zásobními kulturami příslušných kmenů mykobakterií pomocí sterilních očkovacích tyček.
2. Zkumavky inkubujte s povolenými víčky v aerobním prostředí obohaceném oxidem uhličitým (5 – 10 %) při teplotě 35 ± 2 °C, dokud nezískáte rozsáhlý nárůst (obvykle během 2 – 3 týdnů).
3. Sejměte nárůst sterilní ostrou aplikační tyčkou opatrným odstraněním buněk z povrchu média a dávejte pozor, abyste neodebrali spolu s buňkami i kultivační médium.
 - a. Pro *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Přeneste nárůst do 5,0 mL bujónu Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol ve sterilní skleněné zkumavce se šroubovacím víčkem obsahující sterilní skleněné kuličky.
 - (2) Dobře promíchejte (po několik minut), aby se v suspenzi nevyskytovaly velké shluky.
 - (3) Porovnejte tuto suspenzi s nefelometrickým standardem č. 1 dle McFarlanda. Suspenze musí být více zakalená než standard.
 - (4) Vložte zkumavku do držáku na 2 – 3 hodiny při pokojové teplotě a umožněte usazení velkých částic na dně.
 - (5) Přeneste supernatant do sterilní nádoby.
 - (6) Upravte zakalení suspenze na McFarlandův standard č. 1 (10^8 KTJ/mL) pomalým přidáváním sterilního média Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol. Řádně protřepejte.
 - (7) Před použitím nařed'te na koncentraci 10^5 KTJ/mL. Dobře promíchejte a naočkejte testovací médium pomocí 0,01 mL kalibrované kličky.
 - b. Pro všechny ostatní kmeny mykobakterií:
 - (1) Přeneste narostlé kolonie do sterilní 50 mL centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem, která obsahuje 8 – 12 sterilních skleněných kuliček (průměr 2 mm) a 5 mL diluentu pro mykobakterie připraveného následujícím způsobem:
 - Promíchejte následující složky v láhvi o objemu 1 L a upravte pH pomocí 1N hydroxidu sodného na hodnotu 6,7 – 7,0.

Hovězí albumin (bez obsahu mastných kyselin)	1,0 g
Polysorbát 80	0,1 mL
Čištěná voda	500 mL
 - Sterilizujte membránovou filtrací (filtr o velikosti 0,2 μ)
 - Asepticky rozdělte na objemy po 5,5 mL do sterilních centrifugačních zkumavek se šroubovacím víčkem.
 - (2) Zhotovte emulzi z narostlých mykobakteriálních kolonií na boční stěně centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem pomocí aplikační tyčky. Promíchejte nárůst s diluentem.
 - (3) Zavičkejte zkumavku a promíchejte ve vortexu přibližně po dobu 10 minut, dokud nedojde k dobré suspenzi nárůstu a rozpuštění velkých shluků.
 - (4) Přidejte 15 mL sterilního diluentu pro mykobakterie a pečlivě promíchejte.
 - (5) Porovnejte tuto suspenzi s nefelometrickým standardem č. 1 dle McFarlanda. Suspenze musí být více zakalená než standard.
 - (6) Vložte zkumavku do držáku na 2 – 3 hodiny při pokojové teplotě a umožněte usazení velkých částic na dně.
 - (7) Odsajte supernatant a přeneste jej do sterilní nádoby. Suspenze musí být více zakalená než McFarlandův standard č. 1 a nesmí obsahovat velké částice. Pokud jsou stále přítomny velké částice, promíchejte a nechte odstát další 1 hodinu. Přeneste supernatant do sterilní nádoby.
 - (8) Upravte zakalení suspenze na McFarlandův standard č. 1 (10^8 KTJ/mL) pomalým přidáváním sterilního diluentu pro mykobakterie. Řádně protřepejte.
 - (9) Rozdělte stejnoměrně suspenzi do mrazicích zkumavek označených identifikačním kódem mikroorganismu a datem přípravy.
 - (10) Zmrazte suspenzi vložením zkumavek do nízkoteplotního mrazicího boxu při teplotě -60 °C. Zkumavky je možné skladovat až 6 měsíců.
 - (11) Před použitím vyjměte zmrzlé zkumavky z mrazicího boxu a rychle rozmrazte obsah vložením zkumavky do vodní lázně o teplotě 30 – 35 °C. Před použitím nařed'te na koncentraci 10^5 KTJ/mL. Dobře promíchejte a naočkejte testovací médium pomocí 0,01 mL kalibrované kličky.

B. Postup pro testovací média

1. Naočkujte reprezentativní vzorky níže uvedenými kulturami.
 - a. Pomocí sterilních jednorázových 0,01 mL kalibrovaných kliček naočkujte zkumavky pomocí kultur připravených výše popsáním způsobem.
 - b. Inkubujte zkumavky s povoleným víčkem při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$ v aerobním prostředí obohaceném oxidem uhličitým.
2. Po 7, 14 a, pokud je to nutné, 21 dnech zkontrolujte u zkumavek nárůst a zabarvení.
3. Očekávané výsledky

Organismy CLSI	ATCC	Výtěžnost
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Nárůst
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , skupina I	12478	Nárůst
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , skupina II	19981	Nárůst
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , skupina III	13950	Nárůst
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , skupina IV	6841	Nárůst

*Doporučený kmen organismu pro kontrolu kvality uživatelem.

III DODATEČNÁ KONTROLA KVALITY

1. Zkontrolujte zkumavky, jak je popsáno v části „Zhoršování kvality výrobku“.
2. Vizually zkontrolujte reprezentativní zkumavky, abyste zajistili, že žádné přítomné fyzické defekty neinterferují s použitím.
3. Aerobně inkubujte nenaočkované reprezentativní zkumavky při teplotě $20 - 25^\circ\text{C}$ a $30 - 35^\circ\text{C}$ a po 7 dnech zkontrolujte, zda nedošlo k mikrobiální kontaminaci.

INFORMACE O PRODUKTU

IV ÚČEL POUŽITÍ

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol je suplementované médium podporující růst mykobakterií, včetně *M. tuberculosis*. Používá se primárně pro růst čistých kultur mykobakterií používaných v laboratorních studiích.

V SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Middlebrook a kol. vyvinuli základní složení bujónu 7H9 ve stejné době, kdy navrhli agarový základ 7H10.¹⁻³ Oba typy médií podporují růst mykobakterií při suplementaci média živinami, jako je např. glycerol, kyselina olejová, albumin a dextróza, s výjimkou *M. bovis*, jehož růst je glycerolem inhibován.

Toto médium se používá při přípravě inokula pro antimikrobiální testy, jako základní médium pro biochemické testy a pro subkultivaci zásobních kmenů.

VI ZÁSADY POSTUPU

Velké množství anorganických solí v tomto médiu poskytuje nezbytné látky pro růst mykobakterií. Citrát sodný po převedení na kyselinu citrónovou zachycuje určité anorganické kationty v roztoku. Chlorid sodný, hovězí albumin, dextróza a kataláza představují složky obohacení Middlebrook ADC. Albumin působí jako protektivum tím, že váže volné mastné kyseliny, které mohou být pro druh *Mycobacterium* toxické. Toxické peroxidy, které mohou být přítomny v médiu, jsou odbourávány katalázou. Dextróza je zdrojem energie. Nezbytné elektrolyty zajišťuje chlorid sodný. Suplementace glycerolem zajišťuje lepší růst mykobakterií.

VII ČINIDLA

Bujón Middlebrook 7H9 Broth

Přibližné složení* na litr čištěné vody

Dihydrogenfosforečnan draselný.....	2,0 g	Citrát železito-amonný	0,04 g
Fosforečnan disodný	1,5 g	Síran hořečnatý.....	0,05 g
Glutamát sodný	0,5 g	Síran zinečnatý	0,001 g
Citrát sodný	0,1 g	Síran měďnatý	0,001 g
Síran amonný	0,5 g	Biotin.....	0,5 mg
Pyridoxin.....	0,001 g	Chlorid vápenatý	0,5 mg

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

Kompletní médium v předem připravených zkumavkách obsahuje, kromě výše uvedených látek, na každý litr 2 mL glycerolu a součástí obohacení ACD, konkrétně:

Chlorid sodný.....	0,85 g
Hovězí albumin (frakce V).....	5,0 g
Dextróza	2,0 g
Kataláza	4,0 mg
Pyruvát sodný.....	1,0 g

Varování a bezpečnostní opatření: Pro diagnostiku *in vitro*.

Zkumavky utěsněné víčky by měly být otevírány opatrně, aby nedošlo ke zranění při případném rozbití skla.

Při laboratorní práci s klinickými vzorky, při nichž nedochází ke vzniku aerosolů, například při přípravě nátěrů k testu acidorezistence, jsou požadovány postupy a vybavení odpovídající 2. stupni biologické bezpečnosti. Všechny činnosti, při nichž vznikají aerosoly, je nutno provádět v mikrobiologickém bezpečnostním boxu třídy I nebo II. Postupy a vybavení odpovídající 3. stupni biologické bezpečnosti jsou požadovány při laboratorních činnostech týkajících se propagace kultur *M. tuberculosis* a *M. bovis* a manipulace s nimi. Také studie na zvířatech vyžadují speciální postupy.⁴

Během celého procesu dodržujte postupy sterilizace a zavedená opatření proti mikrobiologickým rizikům. Zkumavky s preparáty, nádoby se vzorky a další kontaminované materiály je nutné po jejich použití sterilizovat v autoklávu a poté zlikvidovat.

Pokyny ke skladování: Po převzetí skladujte zkumavky na tmavém místě při teplotě 2 – 8 °C. Chraňte před mrazem a přehřátím. Otevřete až bezprostředně před použitím. Minimalizujte vystavení slunečnímu záření. Média ve zkumavkách uložená dle uvedených pokynů až do doby těsně před použitím je možné naočkovat až do data expirace a inkubovat po doporučenou inkubační dobu včetně až 8 týdnů u médií pro mykobakteriologická vyšetření. Před naočkováním počkejte, než se médium ohřeje na pokojovou teplotu.

Zhoršování kvality výrobku: Výrobek nepoužívejte, pokud vykazuje mikrobiální kontaminaci, změnu barvy, vysušení nebo jiné známky zhoršení kvality.

VIII ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE S NIMI

K manipulaci se vzorky vhodnými ke kultivaci lze využít několik různých metod. Detailní informace naleznete v příslušné literatuře.^{5,6} Vzorky by měly být získány ještě předtím, než jsou aplikována antimikrobiální činidla. Je nutné zajistit jejich promptní přepravu do laboratoře.

IX POSTUP

Dodaný materiál: Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

Potřebný materiál, který není součástí dodávky: Pomocná kultivační média, činidla, organismy pro kontrolu kvality a další laboratorní vybavení dle potřeby.

Provedení testu: Dodržujte aseptické postupy.

Po naočkování uložte zkumavky do vhodného systému poskytujícího aerobní prostředí obohacené 5 – 10 % oxidu uhličitého. Inkubujte při teplotě 35 ± 2 °C po dobu až 8 týdnů. Zkumavky musí mít povolená víčka po dobu prvních 3 týdnů, aby byla umožněna cirkulace oxidu uhličitého důležitá pro iniciaci růstu. Abyste předešli vysušení, utáhněte poté víčka a krátce je povolujte jednou týdně.

Kontrola kvality uživatelem: Viz „Postupy kontroly kvality“.

Každá šarže médií prošla testováním příslušnými organismy ke kontrole kvality a výsledky odpovídají produktovým specifikacím a normám CLSI v relevantních případech. Jako obvykle je nutné kontrolu kvality provést v souladu s platnými místními, státními a federálními zákony nebo požadavky pro akreditaci a se standardními postupy kontroly kvality vaší laboratoře.

X VÝSLEDKY

Během 5 – 7 dní po naočkování zkontrolujte kultury a totéž poté provádějte jednou týdně po dobu až 8 týdnů. Nárůst mykobakterií ve zkumavkách s bujónem je možné použít pro další laboratorní testy dle potřeby.

XI OMEZENÍ POSTUPU

Pro účely identifikace musí být organismy v čisté kultuře. Pro konečnou identifikaci je nutné provést morfologické, biochemické a/nebo serologické testy. Podrobné informace a doporučené postupy naleznete v příslušných publikacích.⁵⁻⁷

XII SPECIFICKÉ VLASTNOSTI ÚČINNOSTI

Před uvedením na trh jsou všechny šarže bujónu Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol testovány z hlediska účinnosti. Pomocí 0,01 mL kalibrované kličky jsou reprezentativní vzorky šarže naočkovány kulturami *Mycobacterium kansasii* Group I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Group II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Group III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Group IV (ATCC 6841) a *M. tuberculosis* (ATCC 25177) naředěnými na hodnotu 10³ kolonií tvořících jednotek (KTJ) v 0,01 mL. Po naočkování jsou zkumavky inkubovány s povoleným víčkem při teplotě 35 ± 2 °C v prostředí obohaceném oxidem uhličitým (5 – 10 %). Nárůst ve zkumavkách se odečítá po 7, 14 a 21 dnech inkubace. Všechny mikroorganismy vykazují střední až intenzivní nárůst během 21 dní.

XIII DOSTUPNOST

Kat. č.	Popis
221832	BD BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 mL

XIV ODKAZY

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.

BD Diagnostics Technická podpora: obraťte se na místního zástupce společnosti BD nebo navštivte www.bd.com/ds.



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