

POSTUPCI KONTROLE KVALITETE**I UVOD**

Agar Middlebrook i Cohn 7H10 je podloga stanične kulture za uzgoj mikobakterija.

II POSTUPAK ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI**A. Postupak za pripremanje inokulata**

1. Inokulirajte kosu podlogu Lowenstein-Jensen s koncentriranim kulturama odgovarajućih mikobakterijskih sojeva pomoću sterilnih štapića za inokulaciju.
2. Epruvete inkubirajte s djelomično otvorenim poklopcima na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi kojoj je dodan ugljični dioksid sve dok se ne dobije jak rast (obični u roku od 2 do 3 tjedna).
3. Uklonite naraslu kulturu sa sterilnim naoštrenim štapićem za aplikaciju laganim uklanjanjem stanica s površine podloge i pazite da staničnim prinosom ne onečistite podlogu.
 - a. Za *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Prebacite rast u 5,0 mL bujona Middlebrook 7H9 s glicerolom u sterilnu staklenu epruvetu s navojnim čepom koja sadrži sterilne staklene kuglice.
 - (2) Dobro promiješajte mikserom (nekoliko minuta) sve dok iz otopine ne uklonite velike grude.
 - (3) Usporedite otopinu sa standardom nefelometra McFarland br. 1. Otopina treba biti mutnija od standarda.
 - (4) Epruvetu postavite u okvir na 2 – 3 h pri sobnoj temperaturi da biste omogućili da se veliki dijelovi slegnu na dno.
 - (5) Prebacite supernatant u sterilni spremnik.
 - (6) Prilagodite zamućenost otopine standardu McFarland br. 1 laganim dodavanjem sterilnog bujona Middlebrook 7H9 s glicerolom. Dobro protresite.
 - (7) Razrijedite na 10^5 CFU/mL prije korištenja. Dobro izmiješajte i razmažite inokulat na podlogu za ispitivanje pomoću kalibrirane ušice od 0,01 mL.
 - b. Za sve ostale sojeve mikobakterija:
 - (1) Prebacite dobiveno u sterilnu epruvetu od 50 mL za centrifugiranje s navojnim čepom koja sadrži 8 – 12 sterilnih staklenih kuglica (promjera 2 mm) i 5 mL mikobakterijske otopine koja je pripremljena na sljedeći način:
 - Izmiješajte sljedeće sastojke u boci od 1 L i prilagodite pH pomoću natrijevog hidroksida 1N, na 6,7 – 7,0:
Govedi albumin (bez masnih kiselina) 1,0 g
Polisorbat 80.....0,1 mL
Pročišćena voda 500 mL
 - Sterilizirajte membranskom filtracijom (filtrar od 0,2 µ).
 - Aseptički prenesite po 5,5 mL u sterilne epruvete s navojnim čepom.
 - (2) Emulgirajte mikobakterijski rast na bočnoj strani epruvete za centrifugiranje s navojnim čepom pomoću štapića za aplikaciju. Promiješajte soj i razrjeđivač.
 - (3) Zatvorite epruvetu i „promiješajte mikserom“ približno 10 min sve dok se ne dobije dobro izmiješana otopina bez grudica.
 - (4) Dodajte 15 mL sterilne mikobakterijske otopine i dobro izmiješajte.
 - (5) Usporedite otopinu sa standardom nefelometra McFarland br. 1. Otopina treba biti mutnija od standarda.
 - (6) Epruvetu postavite u okvir na 2 – 3 h pri sobnoj temperaturi da biste omogućili da se veliki dijelovi slegnu na dno.
 - (7) Aspirirajte supernatant i prebacite ga u sterilni spremnik. Otopina treba biti mutnija od standarda McFarland br. 1 i bez velikih neotopljenih dijelova. Ako su još prisutni veliki dijelovi, promiješajte i pričekajte da se slegne dodatnih 1 h. Prebacite supernatant u sterilni spremnik.
 - (8) Prilagodite zamućenost otopine standardu McFarland br. 1 laganim dodavanjem sterilne mikobakterijske otopine. Dobro protresite.
 - (9) Alikvote otopine stavite u epruvete za zamrzivač i označite ih vrstom organizama koje sadrže i datumom pripreme.
 - (10) Zamrznete otopine na niskoj temperaturi u zamrzivaču na -60 °C. Epruvete možete čuvati do 6 mjeseci.

- (11) Za upotrebu izvadite zamrznute epruvete iz zamrzivača i brzo otopite sadržaj postavljanjem bočica u vodenu kupelj na 30 – 35 °C. Razrijedite na 10⁵ CFU/mL prije korištenja. Dobro izmiješajte i razmažite inokulat na podlogu za ispitivanje pomoću kalibrirane ušice od 0,01 mL.

B. Postupci za ispitivanje podloga

1. Inokulirajte reprezentativne uzorke dolje navedenim kulturama.
 - a. Površine agara moraju biti bez vlage prije inokulacije.
 - b. Inokulirajte ispitne spremnike sa sterilnom jednokratnom kalibriranom petljom od 0,01 mL pomoću mikobakterijskih kultura pripremljenih prema prethodno opisanom postupku.
 - c. Inkubirajte sve spremnike s djelomično otvorenim poklopcima na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi kojoj je dodan ugljični dioksid.
 - d. Uključite epruvete prethodno ispitanog agara Middlebrook 7H10 za kontrolu.
2. Pregledajte spremnike 7, 14 i, prema potrebi, 21 dan i provjerite rast, selektivnost i pigmentaciju.
3. Očekivani rezultati

Organizam	ATCC	Izolacija
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Rast
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , grupa I	12478	Rast
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , grupa II	19981	Rast
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , grupa III	13950	Rast
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , grupa IV	6841	Rast

*Preporučeni soj organizama za korisničku kontrolu kvalitete.

NAPOMENA: Potrebna je korisnička kontrola, prema pravilu CLSI M22-A3.

III DODATNA KONTROLE KVALITETE

1. Provjerite epruvete ili boce prema objašnjenju iz poglavlja „Pogoršanje kvalitete proizvoda”.
2. Vizualno pregledajte reprezentativne epruvete ili boce da biste utvrdili kako nemaju fizičkih oštećenja koja će utjecati na upotrebu.
3. Inkubirajte neinokulirane reprezentativne epruvete ili boce na 20 – 25 °C i 30 – 35 °C pa pregledajte nakon 7 dana jesu li onečišćene mikrobima.

INFORMACIJE O PROIZVODU

IV NAMJENA

Agar Middlebrook i Cohn 7H10 koristi se za kvalitativne postupke u izolaciji i uzgoju mikobakterija.

V SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Tijekom godina mnoge su podloge kultura stvorene za uzgoj mikobakterija. Prve su podloge imale jaje kao temeljni sastojak, a uključivale su podloge Lowenstein-Jensen i Petragnani. Dubos i Middlebrook bili su inovativni u razvoju brojnih formulacija koje su sadržavale oleinsku kiselinu i albumin kao ključne sastojke za bolji rast bacila tuberkuloze i za zaštitu organizama od raznih toksičnih agensa.¹ Prema tome, Middlebrook i Cohn poboljšali su formulaciju agara s oleinskom kiselinom i albuminom te su dobili brži, bogatiji rast vrsta *Mycobacterium* na podlozi određenoj kao 7H10.^{2,3} Zabilježeno je da na podlozi 7H10 raste manje zagađivala nego na podlozi koja se temelji na jajetu i često se koristi za uzgoj mikobakterija.⁴

VI NAČELA POSTUPKA

Agar Middlebrook i Cohn 7H10 sadrže razne anorganske soli koje daju osnovne tvari za rast mikobakterija. Natrijev citrat, nakon pretvaranja u limunsku kiselinu, služi za održavanje određenih anorganskih kationa u otopini. Glicerol je izdašan izvor ugljika i energije. Bacili tuberkuloze koriste oleinsku kiselinu i ostale dugolančane masne kiseline koje imaju važnu ulogu u metabolizmu mikobakterija. Primarni efekt albumina je zaštita bacila tuberkuloze od toksičnih agensa pa stoga poboljšava njihov oporavak u primarnoj izolaciji. Katalaza uništava otrovne perokside koji mogu biti prisutni u podlozi. Djelomična inhibicija bakterija postiže se prisutnošću malahitnog zelenila.

VII REAGENSI

Agar Middlebrook i Cohn 7H10

Približna formula* po litri pročišćene vode

Magnezijev sulfat	0,05 g	Goveđi albumin (frakcija V)	5,0 g
Željezo amonijev citrat	0,04 g	Katalaza	3,0 mg
Natrijev citrat	0,4 g	Piridoksin	1,0 mg
Amonijev sulfat	0,5 g	Cinkov sulfat	1,0 mg
Mononatrijev glutamat	0,5 g	Bakar sulfat	1,0 mg
Dinatrijev fosfat	1,5 g	Biotin	0,5 mg
Monokalijev fosfat	1,5 g	Kalcijev klorid	0,5 mg
Agar	13,5 g	Malahitno zelenilo	0,25 mg
Natrijev klorid	0,85 g	Oleinska kiselina	0,06 mL
Dekstroza	2,0 g	Glicerol	5,0 mL

*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

Upozorenja i mjere opreza: Za *in vitro* dijagnostiku.

Epruvete i bočice s pričvršćenim poklopcima trebaju se oprezno otvarati kako ne bi došlo do ozljeda pri pucanju stakla.

U kliničkim uzorcima mogu biti prisutni patogeni mikroorganizmi, uključujući viruse hepatitisa i virus humane imunodeficijencije. Pri rukovanju svim predmetima kontaminiranim krvlju i drugim tjelesnim tekućinama treba se pridržavati „Standardnih mjera opreza“⁵⁻⁸ i institucionalnih smjernica. Pripremljene epruvete, spremnike uzoraka i druge kontaminirane materijale sterilizirajte u autoklavu prije odlaganja u otpad.

Načini rada i postupci, oprema i sredstva biološke sigurnosti razine 2 potrebni su za rukovanje kliničkim uzorcima koji ne stvaraju aerosol kao što je priprema razmaza otpornih na kiselinu. Sve radnje kojima se stvara aerosol moraju se raditi u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu klase I ili II. Postupci, oprema i sredstva biološke sigurnosti razine 3 potrebni su za laboratorijske radnje vezane za množenje i rukovanje kulturama *M. tuberculosis* i *M. bovis*. Za istraživanja na životinjama također su potrebni posebni postupci.⁷

Upute za čuvanje: Epruvete i bočice po primitku pohranite na tamnom mjestu na temperaturi od 2 °C do 8 °C. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Otvorite neposredno prije upotrebe. Smanjite izlaganje svjetlosti na najmanju moguću mjeru. Podloge pohranjene prema uputama prije same upotrebe mogu se inkulirati sve do isteka roka valjanosti i inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije. Prije inkulacije pričekajte da se podloga zagrije do sobne temperature.

Pogoršanje kvalitete proizvoda: Ne upotrebljavajte epruvete niti bočice ako imaju vidljive znakove kontaminacije mikrobima, promjene boje, sušenja ili ostale znakove pogoršanja kvalitete.

VIII PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE

Uzorci pogodni za podlogu mogu se obraditi raznim tehnikama. Detaljne informacije potražite u odgovarajućim tekstovima.⁹⁻¹¹ Uzorke treba uzeti prije obrade protumikrobnih agensa. Potrebno je izraditi propise za brzu dostavu u laboratorij.

IX POSTUPAK

Priloženi materijal: Agar Middlebrook i Cohn 7H10

Potreban materijal koji se nabavlja zasebno: podloga za dodatne kulture, reagensi, organizmi za kontrolu kvalitete i laboratorijska oprema prema potrebi.

Postupak ispitivanja: Primjenjujte aseptične tehnike.

Koriste se postupci ispitivanja koje preporučuje Centar za kontrolu i prevenciju (CDC) za primarnu izolaciju iz uzoraka koji sadrže mikobakterije.⁹ Preporučuje se otopina N-acetil-L-cistein-natrijevog hidroksida (NALC-NaOH) kao blagi, ali učinkoviti agens za digestiju i dekontaminaciju. Ti reagensi dio su mikobakterijskog kompleta za digestiju/dekontaminaciju mikobakterija **BBL MycoPrep**. Za detaljne upute o dekontaminaciji i uzgoju provjerite odgovarajuće reference.⁹⁻¹²

Nakon inkulacije zaštitite spremnike od svjetlosti i postavite u odgovarajući sustav uz aerobnu atmosferu obogaćenu ugljičnim dioksidom. Inkubirajte na 35 ± 2 °C.

Kose podloge i podloge u boci trebate inkulirati u vodoravnom položaju sve dok se inkulum ne apsorbira. Epruvete i boce trebaju imati odvijene navojne čepove u prva 3 tjedna kako bi se omogućila cirkulacija ugljičnog dioksida za pokretanje rasta. Nakon toga zatvorite čepove da biste spriječili dehidraciju; jednom tjedno na kratko ih odvijte. Postavite epruvete u uspravan položaj ako nemate dovoljno prostora.

NAPOMENA: Kulture kožnih lezija za koje se sumnja na *M. marinum* ili *M. ulcerans* treba inkubirati na 25 – 33 °C za primarnu izolaciju; kod kultura za koje se sumnja na *M. avium* ili *M. xenopi* provjerite optimalni rast na 40 – 42 °C.⁹ Inkubirajte dvostruku kulturu na 35 – 37 °C.

Korisnička kontrola kvalitete: Pogledajte poglavlje „Postupci kontrole kvalitete“.

Zahtjevi kontrole kvalitete moraju biti ispunjeni u skladu s važećim lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima ili uvjetima akreditiranja i postupcima standardne kontrole kvalitete vašeg laboratorija. Preporučuje se da korisnik konzultira relevantne smjernice CLSI-ja i propise CLIA kako bi se upoznao s odgovarajućim postupcima kontrole kvalitete.

X REZULTATI

Kulture treba očitati u roku 5 – 7 dana nakon inokulacije i jednom tjedno nakon toga u trajanju od maksimalno 8 tjedana. Zabilježite zapažanja:⁹

1. Broj dana potreban da bi kolonije postale makroskopski vidljive. Brzorastući organizmi imaju zrele kulture u roku 7 dana; spororastućima treba više od 7 dana za formiranje zrelih kolonija.
2. Broj kolonija (boce):
Nema kolonija = Negativno
Manje od 50 kolonija = Stvarni broj
50 – 100 kolonija = 1+
100 – 200 kolonija = 2+
Gotovo tekuće (200 – 500) = 3+
Tekuće (više od 500) = 4+
3. Stvaranje pigmenta:
Bijeli, bež ili prljav = Nekromogenski (NC)
Limunasto, žuto, narančasto, crveno = Kromogenski (Ch)

Razmazi bojenja mogu pokazati bacile otporne na kiseline koje bilježe samo kao „bacili otporni na kiseline“ osim u slučaju izvođenja konačnih ispitivanja.

Boce možete pregledati invertiranjem boca u stanju mikroskopskog seciranja. Očitajte pri povećanju 10 – 60x s transmisijskom svjetlošću. Brzo skenirajte na 10 – 20x i provjerite prisutnost kolonija. Veće povećanje (30 – 60x) korisno je za provjeru morfologije kolonije, odnosno u slučaju krivudavih kolonija nalik na užad.

XI OGRANIČENJA POSTUPKA

Za identifikaciju organizmi moraju biti u čistoj kulturi. Za konačnu identifikaciju potrebno je provesti morfološka, biokemijska i/ili serološka ispitivanja. U odgovarajućim poglavljima potražite dodatne informacije i preporučene postupke.⁹⁻¹²

XII RADNA SVOJSTVA

Prije izdavanja ispituju se očekivana radna svojstva svih pakiranja agara Middlebrook and Cohn 7H10. Pomoću kalibrirane ušice od 0,01 mL reprezentativni uzorci serije inokulirani su razmazivanjem s kulturama otopljenima kako bi sadržavale 10⁵ kolonija koje stvaraju jedinice (CFU) u svakom mL *Mycobacterium kansasii* grupe I (ATCC 21478), *M. scrofulaceum* grupe II (ATCC 19981), *M. intracellulare* grupe III (ATCC 13950), *M. fortuitum* grupe IV (ATCC 6841) i *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Nakon inokulacije, spremnici se inkubiraju s djelomično otvorenim poklopcima na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi kojoj je dodano 5 do 10% ugljičnog dioksida. Rast i pigmentacija u spremnicima očitavaju se nakon 7, 14 i 21-og dana inkubacije. Svi organizmi pokazuju umjeren do jak rast u roku 21 dana. Pigmentacija kolonija je sljedeća: *M. kansasii* ima bijelu do bež-žutu boju; *M. scrofulaceum* srednje je žute do narančaste boje; *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* i *M. fortuitum* imaju bež boju.

XIII DOSTUPNOST

Kat. br.	Opis
220958	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (kosi agar), pakiranje od 10 epruveta veličine A
220959	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (kosi agar), pakiranje od 100 epruveta veličine A
297448	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (kosi agar), pakiranje od 10 epruveta veličine C
297396	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (kosi agar), pakiranje od 100 epruveta veličine C
297274	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (kosi agar), pakiranje od 100 boca od 0,029 L

XIV 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, and W.B. 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. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
7. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
8. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262*, 17/10/2000, p. 0021-0045.
9. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Cernoch, P.L., R.L. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
12. Metchock, B.G., F.S. Nolte, and R.J. Wallace, Jr. 1999. *Mycobacterium*, p. 399-437. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Tehnički servis i podrška na BD Diagnostics: obratite se lokalnom predstavniku tvrtke BD ili posjetite 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