

## МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА (Дополнительно)

## I ВВЕДЕНИЕ

Бульон Миддлбрука 7H9 с глицерином (Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol) представляет собой неселективную питательную среду для культивирования микобактерий.

## II МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ

## А. Методика подготовки инокулята

1. С помощью стерильных палочек для посева засейте скошенные питательные среды Левенштейна-Йенсена исходными культурами подходящих штаммов микобактерий.
2. Выдерживайте неплотно закрытые пробирки в аэробной атмосфере, обогащенной диоксидом углерода (5 – 10 %), при температуре  $35 \pm 2$  °С, до получения обильной культуры (обычно в течение 2 – 3 недель).
3. Соберите культуру с помощью стерильного заостренного аппликатора, аккуратно удаляя клеточную массу с поверхности среды. Не захватывайте питательную среду при сборе клеточной массы.
  - а) методика для *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177.
    - (1) Поместите культуру в 5,0 мл бульона Миддлбрука 7H9 с глицерином в стерильной стеклянной пробирке с завинчивающейся крышкой и стерильными стеклянными шариками.
    - (2) Перемешайте в вортексе (в течение нескольких минут), пока в суспензии не разойдутся крупные комки.
    - (3) Сравните суспензию с нефелометрическим стандартом Макфарланда № 1. Суспензия должна быть более мутной по сравнению со стандартом.
    - (4) Поместите пробирку в штатив на 2 – 3 часа и дайте отстояться при комнатной температуре, чтобы крупные частицы осели на дно.
    - (5) Перелейте надосадочную жидкость в стерильный контейнер.
    - (6) Установите мутность суспензии по стандарту Макфарланда № 1 ( $10^8$  КОЕ/мл), медленно добавляя стерильный бульон Миддлбрука 7H9 с глицерином. Хорошо встряхните.
    - (7) Перед использованием разбавьте до  $10^5$  КОЕ/мл. Тщательно перемешайте суспензию и засейте тестовую среду, используя калиброванную петлю 0,01 мл.
  - б) методика для остальных штаммов микобактерий.
    - (1) Поместите культуру в стерильную пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл с завинчивающейся крышкой, содержащую 8 – 12 стерильных стеклянных шариков (диаметром 2 мм) и 5 мл растворителя для микобактерий, приготовленного следующим образом.
      - Смешайте следующие ингредиенты в колбе вместимостью 1 л и установите pH в интервале 6,7 – 7,0, используя 1н. раствор гидроксида натрия.  
Альбумин бычьей сыворотки (без жирных кислот)..... 1,0 г  
Полисорбат 80..... 0,1 мл  
Очищенная вода ..... 500 мл
      - Выполните стерилизацию фильтрованием через мембранный фильтр (фильтр с размером пор 0,2 мкм).
      - Соблюдая правила асептики, перенесите порции по 5,5 мл в стерильные пробирки для центрифугирования с завинчивающимися крышками.
    - (2) Приготовьте эмульсию культуры микобактерий на боковой стенке пробирки для центрифугирования с завинчивающейся крышкой, используя аппликатор. Смешайте культуру с растворителем.
    - (3) Закройте пробирку крышкой и поместите в вортекс примерно на 10 минут, пока культура не превратится в суспензию без крупных комков.
    - (4) Добавьте 15 мл стерильного растворителя для микобактерий и тщательно перемешайте.
    - (5) Сравните суспензию с нефелометрическим стандартом Макфарланда № 1. Суспензия должна быть более мутной по сравнению со стандартом.
    - (6) Поместите пробирку в штатив на 2 – 3 часа и дайте отстояться при комнатной температуре, чтобы крупные частицы осели на дно.
    - (7) Отберите пипеткой надосадочную жидкость и перенесите ее в стерильный контейнер. Суспензия должна быть более мутной, чем стандарт Макфарланда № 1, и не должна содержать крупных частиц. Если крупные частицы все же присутствуют, перемешайте и дайте отстояться дополнительно в течение часа. Перенесите надосадочную жидкость в стерильный контейнер.
    - (8) Установите мутность суспензии в соответствии со стандартом Макфарланда № 1 ( $10^8$  КОЕ/мл), медленно добавляя стерильный растворитель для микобактерий. Хорошо встряхните.
    - (9) Отберите аликвотные пробы суспензии во флаконы для замораживания с маркировкой идентификации микроорганизма и даты приготовления.
    - (10) Заморозьте суспензии, поместив флаконы в морозильную камеру при температуре  $-60$ °С. Флаконы можно хранить до 6 месяцев.
    - (11) Для использования извлеките замороженный флакон из морозильной камеры и быстро разморозьте содержимое, поместив пробирку в водяную баню с температурой 30 – 35 °С. Перед использованием разбавьте до  $10^5$  КОЕ/мл. Тщательно перемешайте суспензию и засейте тестовую среду, используя калиброванную петлю 0,01 мл.

## Б. Методика тестирования среды

- Засейте репрезентативные образцы перечисленными ниже культурами.
  - с помощью стерильных одноразовых калиброванных бактериологических петель 0,01 мл засейте пробирики культурами, подготовленными описанным выше способом.
  - выдерживайте неплотно закрытые пробирики при температуре  $35 \pm 2$  °С в аэробной атмосфере, обогащенной диоксидом углерода.
- Через 7 и 14 дней (при необходимости — через 21 день) проверьте пробирики на наличие роста и пигментации.
- Ожидаемые результаты

Микроорганизмы CLSI	ATCC	Выделение
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Рост
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , группа I	12478	Рост
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , группа II	19981	Рост
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , группа III	13950	Рост
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , группа IV	6841	Рост

\*Штамм микроорганизма, рекомендуемый для контроля качества.

## III ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Проверьте пробирики, как описано в разделе «Разложение продукта».
- Визуально проверьте репрезентативные пробирики, чтобы убедиться в том, что существующие физические дефекты не будут препятствовать использованию.
- Выдерживайте незасеянные репрезентативные пробирики в аэробной атмосфере при температуре 20 – 25 °С и 30 – 35 °С и проверьте на наличие бактериального загрязнения через 7 дней.

## СВЕДЕНИЯ О ПРОДУКТЕ

### IV НАЗНАЧЕНИЕ

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (бульон Миддлбрука 7H9 с глицерином) представляет собой среду с добавкой, поддерживающую рост микобактерий, включая *M. tuberculosis*. Этот бульон главным образом используется для получения чистых культур микобактерий в целях лабораторных исследований.

### V КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ

Миддлбрук и сотрудники разработали основную рецептуру бульона 7H9 одновременно с созданием базового агара 7H10<sup>1-3</sup>. Среда обоих типов поддерживают рост видов микобактерий при наличии добавок питательных веществ, таких как глицерин, олеиновая кислота, альбумин и декстроза, за исключением *M. bovis*, рост которых ингибируется глицерином.

Эта среда используется в приготовлении культур для определения противомикробной активности, в качестве минимальной среды для биохимических тестов, а также для получения субкультур исходных штаммов.

### VI ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Большое количество неорганических солей в среде обеспечивает вещества, необходимые для роста микобактерий. Натрия цитрат, превращаясь в лимонную кислоту, служит для удержания определенных неорганических катионов в растворе. Натрия хлорид, альбумин бычьей сыворотки, декстроза и каталаза являются компонентами добавки Миддлбрука ADC. Альбумин служит защитным агентом, связывающим свободные жирные кислоты, которые могут быть токсичными для организмов вида *Mycobacterium*. Каталаза разрушает токсичные пероксиды, которые могут присутствовать в среде. Декстроза является источником энергии. Натрия хлорид обеспечивает необходимые электролиты. Добавка глицерина улучшает рост микобактерий.

### VII РЕАГЕНТЫ

#### Middlebrook 7H9 Broth (Бульон Миддлбрука 7H9)

Примерная рецептура\* на литр очищенной воды

Монокалия фосфат .....	2,0	г	Аммония-железа цитрат .....	0,04	г
Динатрия фосфат .....	1,5	г	Магния сульфат.....	0,05	г
Мононатрия глутамат .....	0,5	г	Цинка сульфат.....	0,001	г
Натрия цитрат .....	0,1	г	Меди сульфат .....	0,001	г
Аммония сульфат .....	0,5	г	Биотин.....	0,5	мг
Пиридоксин .....	0,001	г	Кальция хлорид .....	0,5	мг

\*При необходимости изменяется и/или дополняется для соответствия критериям эффективности.

Готовая среда в подготовленных пробирках содержит, помимо указанных компонентов, 2 мл глицерина в одном литре среды, а также следующие компоненты добавки ADC:

Натрия хлорид .....	0,85	г
Альбумин бычьей сыворотки (фракция V).....	5,0	г
Декстроза .....	2,0	г
Каталаза .....	4,0	мг
Натрия пируват .....	1,0	г

**Предупреждения и меры предосторожности.** Для диагностического использования *in vitro*.

Пробирики с плотными крышками следует открывать осторожно, чтобы не разбить пробирку и не пораниться осколками.

При неаэрозольной обработке клинических образцов, например при подготовке окрашивания мазков кислотоустойчивых штаммов, необходимо использовать изолирующее оборудование и средства биологической защиты, а также применять меры биологической безопасности 2 уровня. Все операции, связанные с образованием аэрозолей, необходимо проводить в биологическом защитном шкафу класса I или II. При лабораторной обработке культур *M. tuberculosis* и *M. bovis* необходимо использовать изолирующее оборудование и средства биологической защиты, а также применять меры биологической безопасности 3 уровня. При исследовании животных также требуется соблюдение специальных методик<sup>4</sup>.

При выполнении любых процедур соблюдайте правила асептики и установленные меры биологической безопасности. После использования стерилизуйте в автоклаве подготовленные пробирки, контейнеры для образцов и другие загрязненные материалы перед утилизацией.

**Условия хранения.** После получения храните пробирки в темном месте при температуре 2 – 8 °С. Не допускайте замораживания или перегрева. Открывайте непосредственно перед использованием. Сведите к минимуму воздействие света. Среда, хранящаяся в пробирках в соответствии с указаниями на этикетке, может быть засеяна до истечения срока годности и выдержана в течение рекомендуемого инкубационного периода (до 8 недель для микобактериологических сред). Перед посевом дайте среде нагреться до комнатной температуры.

**Разложение продукта.** При наличии признаков бактериального загрязнения, изменения цвета, высыхания или других признаков разложения продукта не используйте пробирки.

## VIII ВЗЯТИЕ И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Подходящие для культивирования образцы можно обрабатывать, используя различные методики. Подробную информацию см. в соответствующих документах<sup>5,6</sup>. Образцы следует собирать до введения противомикробных средств. Необходимо обеспечить своевременную доставку в лабораторию.

## IX МЕТОДИКА

**Поставляемые материалы.** Бульон Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

**Необходимые, но не поставляемые материалы.** Требуется дополнительная питательная среда, реагенты, культуры микроорганизмов для контроля качества и лабораторное оборудование.

**Методика тестирования.** Соблюдайте асептическую методику работы.

После посева поместите пробирки в подходящую систему, обеспечивающую создание аэробной атмосферы, обогащенной 5 – 10 % диоксида углерода. Выдерживайте при температуре 35 ± 2 °С до 8 недель. В течение первых трех недель не следует плотно закрывать пробирки с завинчивающейся крышкой, чтобы инициировать рост путем циркуляции диоксида углерода. Впоследствии для предотвращения обезвоживания плотно закройте крышки; раз в неделю открывайте на короткое время.

**Контроль качества.** См. раздел «Методики контроля качества».

Все партии среды протестированы с использованием соответствующих микроорганизмов для контроля качества, и данное тестирование соответствует характеристикам продукта и стандартам CLSI, если таковые применимы. Как всегда, проводите тестирование контроля качества в соответствии с применимыми местными законами, законами штата или государственными законами, требованиями аккредитации и (или) методиками контроля качества, принятыми в лаборатории.

## X РЕЗУЛЬТАТЫ

Культуры следует изучать в течение 5 – 7 дней после посева и после этого раз в неделю в течение 8 недель. Культура микобактерий, полученная в пробирках с бульоном, может использоваться для дополнительных лабораторных тестов по мере необходимости.

## XI ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Для идентификации должны использоваться микроорганизмы чистой культуры. Для окончательной идентификации необходимо выполнять морфологические, биохимические и (или) серологические тесты. Дополнительную информацию и рекомендованные методики см. в соответствующих документах<sup>5-7</sup>.

## XII ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Перед выпуском все серии бульона Миддлбука 7H9 с глицерином проходят испытания на эффективность. При помощи калиброванной петли вместимостью 0,01 мл репрезентативные образцы серии засевают культурами, разбавленными до концентрации 10<sup>3</sup> колониеобразующих единиц (КОЕ) в 0,01 мл суспензии *Mycobacterium kansasii* группы I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* группы II (ATCC 19981), *M. intracellulare* группы III (ATCC 13950), *M. fortuitum* группы IV (ATCC 6841) и *M. tuberculosis* (ATCC 25177). После посева пробирки выдерживают неплотно закрытыми при температуре 35 ± 2 °С в атмосфере, обогащенной 5 – 10 % диоксида углерода. Пробирки проверяют на наличие роста после 7, 14 и 21 дня инкубации. Все микроорганизмы проявляют умеренный или активный рост в течение 21 дня.

## XIII НАЛИЧИЕ

№ кат.	Описание
221832	BD BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 мл

#### XIV СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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.

Служба технической поддержки BD Diagnostics: обращайтесь к местному представителю компании BD или на сайт [www.bd.com/ds](http://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