

МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

I ВВЕДЕНИЕ

Агар **BD BBL Seven H11 Agar** представляет собой питательную среду для изоляции и культивирования микобактерий.

II МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ

- Засейте репрезентативные образцы перечисленными далее культурами.
 - Перед посевом убедитесь в том, что на чашках нет влаги.
 - Засейте штрихами для изоляции, используя культуру, разбавленную до содержания 10^3 – 10^4 КОЕ.
 - Выдерживайте чашки при температуре 35 ± 2 °C в аэробной атмосфере, обогащенной диоксидом углерода.
- Через 7–21 день проверьте чашки на наличие роста и пигментации.
- Ожидаемые результаты

Микроорганизмы	АТСС	Выделение
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Рост от умеренного до активного
* <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.

ПРИМЕЧАНИЕ. Требуется мониторинг пользователем в соответствии с CLSI M22-A3.

III ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Проверьте чашки, как описано в разделе «Разложение продукта».
- Визуально проверьте репрезентативные чашки, чтобы убедиться в том, что существующие физические дефекты не будут препятствовать использованию.
- Определите уровень pH потенциометрическим способом при комнатной температуре, чтобы убедиться в соответствии характеристикам $6,6 \pm 0,2$.
- Проверьте устойчивость чашек во время процедуры посева.
- Выдерживайте незасеянные репрезентативные чашки при температуре от 35 ± 2 °C в течение 72 ч и проверьте на наличие бактериального загрязнения.

СВЕДЕНИЯ О ПРОДУКТЕ

IV НАЗНАЧЕНИЕ

Агар **BD BBL Seven H11 Agar** используется в методиках качественного анализа для выделения и культивирования микобактерий. Чашки наполняются полностью, чтобы сократить эффекты высыхания во время продолжительной инкубации.

V КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ

Для культивирования микобактерий были разработаны различные питательные среды. Первоначально использовались рецептуры на яичной основе, в число которых входят среда Левенштейна-Йенсена и среда Петраньяни. Дюбо (Dubos) и Миддлбрук (Middlebrook) разработали ряд рецептур, содержащих олеиновую кислоту и альбумин в качестве основных ингредиентов для обеспечения роста туберкулезных бацилл и защиты микроорганизмов от ряда токсических агентов.¹ Позже Миддлбрук и Кон (Cohn) усовершенствовали рецептуру агара с олеиновой кислотой и альбумином и добились более быстрого и интенсивного роста видов *Mycobacterium* в среде, получившей обозначение 7H10.^{2,3}

Кон и др. изменили рецептуру агара 7H10 Agar, добавив один грамм панкреатического гидролизата казеина на литр для улучшения роста штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, для которых наблюдался слабый рост (или рост вообще отсутствовал), в 7H10 и других обычных изоляционных средах.⁴ Эта рецептура получила название агар **BD BBL Seven H11 Agar**. Во время исследования, проводимого Коном и др., из 96 клинических изолятов 13 не смогли вырасти в среде 7H10 в течение первых трех недель. Десять из этих 13 культур росли в среде Seven H11 в течение трех недель, остальным трем для демонстрации видимого роста потребовалась дополнительная трехнедельная инкубация.⁴

VI ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

В агаре **BD BBL Seven H11 Agar** содержатся различные неорганические соли, которые служат веществами, необходимыми для роста микобактерий. Натрия цитрат, превращаясь в лимонную кислоту, служит для удержания определенных неорганических катионов в растворе. Глицерин является богатым источником углерода и энергии. Панкреатический гидролизат казеина является богатым источником азота для роста туберкулезных бацилл и предоставляет несколько дополнительных факторов роста.¹ Олеиновая кислота, как и другие жирные кислоты с длинной углеводной цепочкой, может использоваться туберкулезными бациллами и играет важную роль в метаболизме микобактерий. Каталаза разрушает токсичные пероксиды, которые могут присутствовать в среде. Основной эффект альбумина заключается в защите туберкулезных бацилл от токсических агентов, что позволяет повысить степень их выделения при первичной изоляции. Частичное ингибирование бактерий достигается благодаря присутствию красителя малахитового зеленого.

VII РЕАГЕНТЫ

BD BBL Seven H11 Agar

Примерная рецептура* на литр очищенной воды

Панкреатический гидролизат казеина	1,0 г	Альбумин бычьей сыворотки V	5,0 г
Магния сульфат	0,05 г	Каталаза	3,0 мг
Железа-аммония цитрат	0,04 г	Пиридоксин	1,0 мг
Натрия цитрат	0,4 г	Цинка сульфат	1,0 мг
Аммония сульфат	0,5 г	Меди сульфат	1,0 мг
Мононатрия глутамат	0,5 г	Биотин	0,5 мг
Динатрия фосфат	1,5 г	Кальция хлорид	0,5 мг
Монокалия фосфат	1,5 г	Малахитовый зеленый	0,25 мг
Агар	13,5 г	Олеиновая кислота	0,06 мл
Натрия хлорид	0,85 г	Глицерин	5,0 мл
Декстроза	2,0 г		

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

Предупреждения и меры предосторожности. Для диагностики *in vitro*.

Если наблюдается избыток влаги, переверните чашку вверх дном со смещенной крышкой и просушите во избежание образования непроницаемого слоя между верхней и нижней частями чашки во время засеивания.

В клинических образцах могут присутствовать патогенные микроорганизмы, в том числе вирус гепатита и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). При работе с любыми предметами, загрязненными кровью и другими биологическими жидкостями, соблюдайте правила, принятые в учреждении, а также стандартные меры предосторожности.⁵⁻⁸ После использования перед утилизацией стерилизуйте в автоклаве подготовленные чашки, контейнеры для образцов и другие загрязненные материалы.

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.⁷

Условия хранения. После получения храните чашки в темноте при температуре от 2 до 8 °C. Избегайте замораживания и перегрева. Открывайте непосредственно перед использованием. Сведите к минимуму воздействие света. Приготовленные чашки, хранящиеся в оригинальной упаковке при температуре от 2 до 8 °C, можно засеивать до истечения срока годности и инкубировать в течение рекомендованного срока, включая 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 чашки.

VIII ВЗЯТИЕ И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Для сбора образцов были разработаны различные тампоны и контейнеры. Образцы следует собирать до проведения противомикробной терапии. Необходимо обеспечить своевременную доставку в лабораторию. Было разработано несколько сред для хранения или транспортировки, таких как продукты для забора и транспортировки образцов **BD BBL**, для продления времени выживания микроорганизмов на случай, когда ожидается длительный перерыв между сбором и подтверждающим культивированием.

Дополнительную информацию о методиках сбора и обработки образцов см. в соответствующих документах.^{9,10}

IX МЕТОДИКА

Поставляемые материалы. BD BBL Seven H11 Agar (Deep Fill)

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

Методика тестирования. Поверхность агара должна быть гладкой и влажной, но без избытка влаги.

Используются методики тестирования, рекомендованные центром по контролю заболеваний США (CDC) для первичного выделения из образцов, содержащих микобактерии.¹¹ Рекомендуется использование раствора N-ацетил-L-цистеина и гидроксида натрия (NALC-NaOH) в качестве мягкого, но эффективного растворяющего и деконтаминирующего вещества.

Эти реагенты входят в набор для ферментации и деконтаминации микобактериальных образцов **BD MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/ Decontamination Kit. Подробные инструкции по деконтаминации и культивированию см. в соответствующих справочных материалах.⁹⁻¹²

После посева защитите чашки от воздействия света и поместите их средой вниз в систему **BD GasPak EZ** или в другую подходящую систему, обеспечивающую поддержание аэробной атмосферы, обогащенной диоксидом углерода, и инкубируйте при температуре 35 ± 2 °C.

ПРИМЕЧАНИЕ. Культуры с участков пораженной кожи, предположительно *M. marinum* или *M. ulcerans*, для предварительной инкубации следует выдерживать при температуре 25–33 °C; оптимальный рост культур, предположительно содержащих *M. avium* или *M. xenopi*, проявляется при температуре 40–42 °C.¹¹ Выдерживайте вторую культуру при температуре 35–37 °C.

Контроль качества.

Следуйте требованиям контроля качества в соответствии с применимыми местными, региональными и (или) федеральными законами, требованиями аккредитации и методиками контроля качества, принятыми в лаборатории. Для получения информации о надлежащих методиках контроля качества пользователям рекомендуется ознакомиться с документацией Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI) и положениями Закона о совершенствовании работы клинических лабораторий (CLIA).

X РЕЗУЛЬТАТЫ

Чашки можно изучать в течение 5–7 дней после посева и после этого раз в неделю в течение 8 недель.

Переверните чашки для их изучения с помощью препаровальной лупы. Считывайте результаты с 10–60-кратным увеличением при проходящем свете. Выполните быстрое сканирование на наличие колоний с 10–20-кратным увеличением. Более значительное увеличение (30–60) используется для наблюдения морфологии колонии, например колоний в виде змеевидных жгутов.

Запишите результаты наблюдения:¹¹

1. Число дней, необходимое для развития колонии до видимых размеров.

2. Число колоний:

отсутствие колоний = отрицательный результат

менее 50 колоний = фактическое число колоний

50–100 колоний = 1+

100–200 колоний = 2+

почти сливающийся рост (200–500 колоний) = 3+

сливающийся рост (более 500 колоний) = 4+

3. Производство пигмента:

белый, кремовый или темно-желтый = нехромогенный (НХ)

лимонный, желтый, оранжевый, красный = хромогенный (Х)

Окрашивание мазков может показать кислотоустойчивые бациллы, которые указываются только как «кислотоустойчивые бациллы», пока не будут выполнены окончательные тесты.¹¹

XI ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Эта среда предназначена для первичной изоляции. Однако для проведения биохимических тестов и применения серологических методик рекомендуется использовать чистую культуру. Дополнительные сведения см. в соответствующих материалах.⁹⁻¹³

XII ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Во время исследования, проведенного Растоги (Rastogi) и др. в институте Пастера, результаты теста лекарственной чувствительности для агара 7H11 Agar были сравнены с радиометрическим методом с помощью системы **BD BACTEC 460TB**. Кроме того, это исследование подтвердило преимущество агара 7H11 Agar над агаром Левенштейна-Йенсена для обычного тестирования лекарственной чувствительности.¹⁴

XIII НАЛИЧИЕ

№ по каталогу	Описание
221870	BD BBL Seven H11 Agar (Deep Fill)

XIV СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 98:295–296.
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. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. 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.
11. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
12. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Soubolle, 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.
13. Isenberg, H.D., F.D. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Rastogi, N., K.S. Goh, and H.L. David. 1989. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion methods using Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 Agar media and a radiometric method. *Res. Microbiol.* 140:405–417.

Служба технической поддержки: обращайтесь к местному представителю компании BD или на сайт www.bd.com.



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.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.