BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

L007468 • Ред. 11 • Апрель 2015

МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

I ВВЕДЕНИЕ

Агар Миддлбрука и Кона 7H10 (Middlebrook and Cohn 7H10 Agar) представляет собой питательную среду для культивирования микобактерий.

II МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ

A. Методика подготовки инокулята

1. С помощью стерильных палочек для посева засейте скошенные питательные среды Левенштейна-Йенсена исходными культурами подходящих штаммов микобактерий.
2. Выдерживайте пробирки с неплотно закрытыми крышками в аэробной атмосфере, обогащенной диоксидом углерода, при температуре 35 ± 2 °C, 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, медленно добавляя стерильный бульона Миддлбрука 7H9 с глицерином. Хорошо встряхните.
      (7) Перед использованием разбавьте до 10^5 КОЕ/мл. Хорошо перемешайте и засейте штрихами 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 объемом 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 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, 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 °C. Флаконы можно хранить до 6 месяцев.

(11) Для использования извлеките замороженный флакон из морозильной камеры и быстро разморозьте содержимое, поместив флакон в водяную баню с температурой 30 – 35 °C. Перед использованием разбавьте до 10^5 КОЕ/мл. Хорошо перемешайте и засейте штрихами тестовую среду, используя калиброванную петлю 0,01 мл.

Б. Методика тестирования среды

1. Засейте репрезентативные образцы перечисленными ниже культурами.
   а) перед посевом убедитесь в том, что на поверхности агара нет влаги;
   б) с помощью стерильных одноразовых калиброванных бактериологических петель 0,01 мл засейте тестовые контейнеры культурами микобактерий, подготовленными описанным выше способом;
   в) выдерживайте неплотно закрытые контейнеры при температуре 35 ± 2 °C в аэробной атмосфере, обогащенной диоксидом углерода;
   г) используйте пробирки с проверенным ранее агаром Миддлбрука 7H10 в качестве контрольных образцов.
2. Через 7 и 14 дней (при необходимости — через 21 день) проверьте контейнеры на наличие роста, селективности и пигментации.
3. Ожидаемые результаты

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

*Штамм микроорганизма, рекомендуемый для контроля качества.

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

III ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Проверьте пробирки или флаконы, как описано в разделе «Разложение продукта».
2. Визуально проверьте репрезентативные пробирки или флаконы, чтобы убедиться в отсутствии физических дефектов, которые могут препятствовать использованию.
3. Выдерживайте незасеянные репрезентативные пробирки или флаконы при температуре 20 – 25 °C и 30 – 35 °C и проверьте на наличие бактериального загрязнения через 7 дней.

СВЕДЕНИЯ О ПРОДУКТЕ

IV НАЗНАЧЕНИЕ

Агар Миддлбрука и Кона 7H10 используется в методиках качественного анализа для выделения и культивирования микобактерий.

V КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ

На протяжении ряда лет 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 и Миддлбрук 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 усовершенствовали рецептуру агара с олеиновой кислотой и альбумином и добились более быстрого и интенсивного роста видов *Mycobacterium* в полученной среде, получившей обозначение 7H10[2,3]. Сообщалось, что в среде 7H10 наблюдается рост меньшего количества микроорганизмов-загрязнителей, чем в среде на яичной основе, обычно используемой для культивирования микобактерий[4].

VI ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Агар Миддлбрука и Кона 7H10 содержит 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. Олеиновая кислота, как и другие жирные кислоты с длинной углеродной цепочкой, может использоваться туберкулезными бациллами и играет важную роль в метаболизме микобактерий. Основной эффект альбумина заключается в защите туберкулезных бацилл от токсических агентов, что позволяет повысить степень их извлечения при первичном выделении. Каталаза разрушает токсичные пероксиды, которые могут присутствовать в среде. Частичное ингибирование бактерий достигается благодаря присутствию красителя малахитового зеленого.

VII РЕАГЕНТЫ

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar (Агар Миддлбрука и Кона 7H10)

Примерная рецептура* на литр очищенной воды

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

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

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

Пробирки и флаконы с плотными крышками следует открывать осторожно, чтобы не пораниться осколками.

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]. Подготовленные пробирки, контейнеры для образцов и другие загрязненные материалы стерилизуйте в автоклаве перед утилизацией.

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 пробирки и флаконы в темном месте при температуре 2 – 8 °C. Не допускайте замораживания или перегрева. Открывайте непосредственно перед использованием. Сведите к минимуму воздействие света. Среда, хранящаяся в соответствии с указаниями на этикетке, может быть засеяна до истечения срока годности и выдержана в течение рекомендуемого инкубационного периода. Перед посевом дайте среде нагреться до комнатной температуры.

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

VIII ВЗЯТИЕ И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Подходящие для культивирования образцы можно обрабатывать, используя различные методики. Подробную информацию см. в соответствующих документах[9-11]. Образцы следует собирать до введения противомикробных средств. Необходимо обеспечить своевременную доставку в лабораторию.

IX МЕТОДИКА

Поставляемые материалы. Middlebrook and Cohn 7H10 Agar (Агар Миддлбрука и Кона 7H10)

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

Методика тестирования. Соблюдайте асептическую методику работы.

Используются методики тестирования, рекомендованные центрами по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) для первичного выделения из образцов, содержащих микобактерии[9]. 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 **BBL MycoPrep**. Подробные инструкции по деконтаминации и культивированию см. в соответствующих справочных материалах[9-12].

После посева защищайте контейнеры от света и поместите их в соответствующую систему, поддерживающую аэробную атмосферу, обогащенную диоксидом углерода. Выдерживайте при температуре 35 ± 2 °C.

Скошенные среды и среды во флаконах следует выдерживать в горизонтальном положении до абсорбции посевного материала. В течение первых трех недель пробирки и флаконы с завинчивающейся крышкой следует держать неплотно закрытыми, чтобы инициировать рост путем циркуляции диоксида углерода. Впоследствии для предотвращения обезвоживания плотно закройте крышки; раз в неделю открывайте на короткое время. При недостатке пространства устанавливайте пробирки вертикально.

ПРИМЕЧАНИЕ. Культуры с участков пораженной кожи, предположительно *M. marinum* или *M. ulcerans*, для первичного выделения следует выдерживать при температуре 25 – 33 °C; оптимальный рост культур, предположительно содержащих *M. avium* или *M. xenopi*, проявляется при температуре 40 – 42 °C[9]. Выдерживайте вторую культуру при температуре 35 – 37 °C.

Контроль качества. См. раздел «Методики контроля 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

Культуры следует изучать в течение 5 – 7 дней после посева и после этого раз в неделю в течение 8 недель. Запишите результаты наблюдения[9].

1. Число дней, необходимое для развития колонии до видимых размеров. При быстром росте колонии созревают в течение 7 дней; при медленном росте требуется более 7 дней для образования зрелых колоний.
2. Число колоний (флаконы):
   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. Выработка 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.

Для исследования флаконов можно перевернуть их при изучении с помощью препаровальной лупы. Считывайте результаты с увеличением в 10 – 60 раз в проходящем свете. Выполните быстрое сканирование на наличие колоний с увеличением в 10 – 20 раз. Более значительное увеличение (в 30 – 60 раз) используется для наблюдения морфологии колонии, например колоний в виде змеевидных жгутов.

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[9-12].

XII ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Перед выпуском все серии агара Миддлбрука и Кона 7H10 проходят испытания на эффективность. При помощи калиброванной петли вместимостью 0,01 мл репрезентативные образцы серии засевают штрихами культурами, разбавленными до концентрации 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл суспензии *Mycobacterium kansasii* группы I (ATCC 21478), *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 контейнеры выдерживают неплотно закрытыми при температуре 35 ± 2 °C в атмосфере, обогащенной 5 – 10 % диоксида углерода. Контейнеры проверяют на наличие роста и пигментации после 7, 14 и 21 дня выдерживания. Все микроорганизмы проявляют умеренный или активный рост в течение 21 дня. Пигментация колоний выглядит следующим образом: *M. kansasii* — от белого до кремово-желтого; *M. scrofulaceum* — от умеренно желтого до оранжевого; *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* и *M. fortuitum* — кремовый.

XIII НАЛИЧИЕ

№ кат.	Описание
220958	**BD BBL** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 10 пробирок размера A в упаковке
220959	**BD BBL** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 100 пробирок размера A в коробке
297448	**BD BBL** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 10 пробирок размера C в упаковке
297396	**BD BBL** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 100 пробирок размера C в коробке
297274	**BD BBL** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, флаконы 30 мл, 100 штук в коробке

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, 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. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Служба технической поддержки BD Diagnostics: обращайтесь к местному представителю компании BD или на сайт 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