



BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

L007467 • Ред. 12 • Жовтень 2015 р.



ПРОЦЕДУРИ З КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ (Необов'язковий)

I ВСТУП

Бульйон Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol – це неселективне культуральне середовище, яке використовується для культивування мікобактерій.

II ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ

A. Процедура приготування інокулятів

1. За допомогою стерильних паличок для посіву інокулюйте скошені Lowenstein-Jensen Medium (середовища Левенштейна – Енсена) вихідними культурами відповідних штамів мікобактерій.
2. Інкубуйте пробірки з нещільно закритими кришками в аеробній атмосфері, збагаченій діоксидом вуглецю, за температури 35 ± 2 °C до початку активного росту бактерій (зазвичай на це потрібно 2 – 3 тижні).
3. Зберіть культуру за допомогою стерильного загостреного аплікатора, акуратно знімаючи клітинну масу з поверхні середовища. Під час збору клітинної маси не захоплюйте поживне середовище.
 - a. Щоб підготувати інокулят культури *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177, виконайте наведені нижче дії.
 - (1) Помістіть культуру разом із 5,0 мл бульйону Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (бульйону Міддлбрука з гліцерином 7H9) у стерильну скляну пробірку з гвинтовою кришкою, яка містить стерильні скляні гранули.
 - (2) Перемішайте у вортексі (протягом кількох хвилин), щоб у суспензії не залишилося великих грудок.
 - (3) Порівняйте суспензію з показником № 1 за стандартом Мак-Фарланда, використовуючи нефелометр. Суспензія має бути каламутнішою, ніж стандарт.
 - (4) Помістіть пробірку в штатив на 2 – 3 години й залиште за кімнатної температури, щоб великі частки осіли на дно.
 - (5) Перелийте надосадову рідину в стерильний контейнер.
 - (6) Відкоригуйте мутність суспензії так, щоб вона відповідала показнику № 1 за стандартом Мак-Фарланда (10^8 КУО/мл). Для цього повільно доливайте стерильний бульйон Міддлбрука з гліцерином 7H9. Добре струсіть.
 - (7) Перед використанням розведіть до концентрації 10^5 КУО/мл. Добре перемішайте й засійте тестове середовище, використовуючи калібровану петлю на 0,01 мл.
 - b. Методика для всіх інших штамів мікобактерій
 - (1) Помістіть культуру в стерильну центрифужну пробірку об'ємом 50 мл із гвинтовою кришкою, яка містить 8 – 12 стерильних скляних гранул (діаметром 2 мм) і 5 мл розчинника для мікобактерій, приготованого, як описано нижче.
 - Змішайте вказані нижче речовини в колбі об'ємом 1 л. Використовуючи 1N гідроксид натрію, відрегулюйте рівень pH до значення 6,7 – 7,0.

Альбумін бичачої сироватки (без жирних кислот)	1,0 г
Полісорбат 80	0,1 мл
Очищена вода	500 мл
 - Простерилізуйте фільтруванням крізь мікропористу мембрану (фільтр 0,2 мкм).
 - В асептичних умовах розлийте по 5,5 мл кожної речовини в стерильні центрифужні пробірки з гвинтовими кришками.
 - (2) Використовуючи аплікатор, емульгуйте мікобактеріальну культуру на бічній стінці центрифужної пробірки з гвинтовою кришкою. Змішайте культуру з розчинником.
 - (3) Закрийте пробірку кришкою та перемішайте у вортексі приблизно 10 хвилин, щоб у суспензії культури не залишилося великих грудок.
 - (4) Додайте 15 мл стерильного розчинника для мікобактерій і ретельно перемішайте.
 - (5) Порівняйте суспензію з показником № 1 за стандартом Мак-Фарланда, використовуючи нефелометр. Суспензія має бути каламутнішою, ніж стандарт.
 - (6) Помістіть пробірку в штатив на 2 – 3 години й залиште за кімнатної температури, щоб великі частки осіли на дно.
 - (7) Аспіруйте надосадову рідину та перелийте її в стерильний контейнер. Суспензія має бути каламутнішою, ніж стандарт Мак-Фарланда № 1, і не містити великих часток. Якщо великі частки досі помітні, перемішайте та дайте відстоятися ще протягом 1 години. Перелийте надосадову рідину в стерильний контейнер.
 - (8) Доведіть мутність суспензії до показника № 1 за стандартом Мак-Фарланда (10^8 КУО/мл), повільно доливаючи стерильний розчинник для мікобактерій. Добре струсіть.
 - (9) Перед розміщенням у морозильній камері розлийте аліквати суспензії у флакони з етикетками, що містять дані ідентифікації мікроорганізму та дату приготування.
 - (10) Заморозьте суспензії, помістивши флакони в морозильну камеру при температурі -60 °C. Флакони можуть зберігатися до 6 місяців.

- (11) Щоб використати флакон, вийміть його з морозильної камери та швидко розморозьте вміст, використавши водяну баню температурою 30 – 35 °С. Перед використанням розведіть до концентрації 10⁵ КУО/мл. Добре перемішайте й засійте тестове середовище, використовуючи калібровану петлю на 0,01 мл.

В. Процедури тестування середовища

1. Засійте показові зразки середовища вказаними нижче культурами мікроорганізмів.
 - а. За допомогою стерильних одноразових каліброваних петель на 0,01 мл інокулюйте пробірки з культурами мікобактерій, приготованими описаним вище способом.
 - б. Інкубуйте пробірки з нещільно закритими кришками в аеробній атмосфері, збагаченій діоксидом вуглецю, при температурі 35 ± 2 °С.
2. На 7-у, 14-у та 21-у добу (за потреби) перевіряйте пробірки на наявність росту мікроорганізмів і появу пігментації.
3. Очікувані результати

Мікроорганізми CLSI	ATCC	Виділення
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Ріст
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , група I	12478	Ріст
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , група II	19981	Ріст
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , група III	13950	Ріст
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , група IV	6841	Ріст

*Штам мікроорганізму, рекомендований для користувацького контролю якості.

III ДОДАТКОВИЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

1. Огляньте пробірки на наявність ознак, описаних у розділі «Псування продукту».
2. Візуально перевірте репрезентативні пробірки й переконайтесь у відсутності фізичних дефектів, які можуть завадити їх використанню.
3. Інкубуйте незасіяні репрезентативні пробірки за температури 20 – 25 °С і 30 – 35 °С, а через 7 і 14 діб перевірте їх на наявність мікроорганізмів.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОДУКТ

IV ПРИЗНАЧЕННЯ

Бульйон Міддлбрука з гліцерином 7Н9 – це допоміжне середовище, яке сприяє росту мікобактерій, зокрема *M. tuberculosis*. Цей бульйон зазвичай використовують для вирощування чистих культур мікобактерій, які готують для лабораторних досліджень.

V КОРОТКИЙ ОГЛЯД І ОПИС

Міддлбрук і його колеги розробили рецептуру бульйону 7Н9 тоді, коли було створено й основу агару 7Н10.¹⁻³ Обидва типи середовищ сприяють росту мікобактерій, якщо їх застосовувати разом із такими поживними речовинами, як гліцерин, олеїнова кислота, альбумін і глюкоза. Проте гліцерин пригнічує ріст бактерій *M. bovis*.

Це середовище призначене для підготовки інокулятів, котрі використовуються під час аналізів на мікроорганізми, а також як мінімальне середовище для проведення біохімічних тестів і пересіювання вихідних штамів.

VI ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

За допомогою різноманітних мінеральних солей у цих середовищах утворюються речовини, потрібні для росту мікобактерій. Утворена з цитрату натрію лимонна кислота стримує поширення неорганічних катіонів. До складу збагачувальної добавки Міддлбрука ADC входять такі речовини: хлорид натрію, альбумін бичачої сироватки, глюкоза й каталаза. Альбумін виконує захисну функцію: він зв'язує вільні жирні кислоти, які можуть бути токсичними для видів *Mycobacterium*. Каталаза сприяє розщепленню токсичних пероксидів, які можуть бути в середовищі. Декстроза – джерело енергії. Хлорид натрію бере участь в утворенні електролітів. Гліцерин сприяє росту мікобактерій.

VII РЕАГЕНТИ

Middlebrook 7H9 Broth

Приблизний склад* на 1 л очищеної води

Фосфат монокалію	2,0 г	Заліза амонійного цитрат	0,04 г
Фосфат динатрію	1,5 г	Сульфат магнію	0,05 г
Глутамат натрію	0,5 г	Сульфат цинку	0,001 г
Цитрат натрію	0,1 г	Сульфат міді	0,001 г
Сульфат амонію	0,5 г	Біотин	0,5 мг
Піридоксин	0,001 г	Хлорид кальцію	0,5 мг

*За необхідності коригується та/або доповнюється для належної ефективності.

Окрім зазначених вище компонентів, повне середовище в підготовлених пробірках містить 2 мл гліцерину й речовини, які входять до складу збагачувальної добавки ADC (на 1 літр), а саме:

Хлорид натрію	0,85 г
Альбумін бичачої сироватки (Fraction V)	5,0г
Декстроза	2,0г
Каталаза	4,0... мг
Натрію піруват	1,0г

Попередження та запобіжні заходи. Для діагностики *in vitro*.

Кришки, які щільно прилягають до пробірок, слід знімати обережно, щоб не розбити скло й не поранитись уламками.

Під час неаерозольної обробки клінічних зразків (наприклад, під час приготування мазків кислотостійких штамів) необхідно використовувати ізолююче обладнання й засоби біологічного захисту, а також застосовувати заходи біологічної безпеки 2-го рівня. Усі дії, пов'язані з утворенням аерозолів, необхідно виконувати в ламінарному боксі біологічного захисту класу I або II. Під час лабораторного розмноження й обробки культур *M. tuberculosis* і *M. bovis* необхідно використовувати ізолююче обладнання та засоби біологічного захисту, а також дотримуватися заходів біологічної безпеки 3-го рівня. Під час дослідження тварин також необхідно дотримуватися спеціальних методик.⁴

Під час виконання будь-яких процедур дотримуйтеся правил асептики та дійте згідно з установленими нормами мікробіологічної безпеки. Після використання перед утилізацією простерилізуйте в автоклаві приготовані пробірки, контейнери для зразків та інші забруднені матеріали.

Інструкції зі зберігання. Після отримання зберігайте пробірки в темряві при температурі від 2 до 8 °C. Запобігайте замороженню та перегріванню. Відкривати слід безпосередньо перед використанням. Мінімізуйте вплив світла.

Середовища, які до самого використання зберігалися в пробірках відповідно до інструкцій на етикетці, можна інокулювати впродовж терміну придатності й інкубувати протягом указанного періоду (до 8 тижнів для мікобактеріологічного середовища). Перед посівом температура середовища має зрівнятися з кімнатною.

Псування продукту Не використовуйте пробірки, якщо ви помітили ознаки непридатності, зокрема мікробного забруднення, зміни кольору, висушування тощо.

VIII ЗАБІР І ОБРОБКА ЗРАЗКІВ

Придатні для культивування зразки можна обробляти, використовуючи різні методики. Докладну інформацію див. у відповідних документах.^{5, 6} Зразки слід збирати до введення протимікробних засобів. Необхідно забезпечити своєчасну доставку в лабораторію.

IX ПРОЦЕДУРА

Матеріал, що входить у комплект. Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

Необхідні матеріали, що не входять у комплект Допоміжні поживні середовища, реагенти, культури мікроорганізмів для контролю якості та лабораторне обладнання, необхідне для цієї процедури.

Процедура тестування Дотримуйтеся правил асептики.

Після інокуляції помістіть пробірки в спеціальну систему, яка підтримує аеробну атмосферу, збагачену діоксидом вуглецю (5 – 10 %). Інкубуйте пробірки за температури 35 ± 2 °C до 8 тижнів. Протягом перших 3 тижнів не слід щільно закривати пробірки: щоб ініціювати ріст культури, потрібна циркуляція діоксиду вуглецю. Потім щільно закрийте кришки, щоб запобігти дегідратації; раз на тиждень на короткий час послабляйте кришку.

Користувацький контроль якості Див. розділ «Процедури з контролю якості».

Кожну партію середовищ було перевірено із застосуванням належних мікроорганізмів для контролю якості. Це тестування відповідає характеристикам продукту та застосовним стандартам Інституту клінічних і лабораторних стандартів (CLSI). Як і всі інші перевірки, тестування з метою контролю якості має проводитися відповідно до застосовних регіональних і державних нормативів, вимог до акредитації та/або стандартних процедур контролю якості вашої лабораторії.

X РЕЗУЛЬТАТИ

Культури слід перевірити через 5 – 7 діб після посіву та надалі перевіряти раз на тиждень протягом 8 тижнів.

Мікобактерії з пробірок із бульйоном можна використовувати для додаткових лабораторних досліджень.

XI ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

Для ідентифікації необхідно використовувати чисті культури мікроорганізмів. Для остаточної ідентифікації слід провести додаткові морфологічні, біохімічні та/або серологічні тести. Докладніші відомості та рекомендовані методики наведено у відповідних довідкових матеріалах.^{5–7}

XII ЕФЕКТИВНІСТЬ

Перед продажем усі партії бульйону Міддлбрука з гліцерином 7H9 проходять перевірку на ефективність. За допомогою каліброваної петлі на 0,01 мл репрезентативні зразки партії висівають разом із культурами, розведеними до концентрації 10³ колонієутворюючих одиниць (КУО) на 0,01 мл бактерій *Mycobacterium kansasii* групи I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* групи II (ATCC 19981), *M. intracellulare* групи III (ATCC 13950), *M. fortuitum* групи IV (ATCC 6841) і *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Після інокуляції пробірки інкубують із нещільно закритими кришками в аеробній атмосфері, збагаченій діоксидом вуглецю (5 – 10 %), за температури 35 ± 2 °C. Через 7, 14 днів і 21 день після початку інкубації пробірки перевіряють на наявність росту мікобактерій. У всіх культур спостерігається помірний або активний ріст протягом 21 дня.

XIII НАЯВНІСТЬ

№ за кат. Опис

221832 Бульйон **BD BBL** Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol у пробірках об'ємом 5 мл

XIV ДОВІДКОВІ МАТЕРІАЛИ

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. Tenenbaum (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 технічної підтримки компанії BD Diagnostics: Зв'яжіться з місцевим представником компанії BD або зверніться за посиланням 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