

ПРОЦЕДУРИ З КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

I ВСТУП

Agar Middlebrook and Cohn 7H10 Agar – це 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 проявів активного росту бактерій (зазвичай протягом 2–3 тижнів).
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) Доведіть мутність суспензії до стандарту Мак-Фарланда № 1, повільно додаючи стерильний бульйон Міддлбрука з гліцерином 7H9. Добре струсіть.
 - (7) Перед використанням розведіть до концентрації 10^5 КУО/мл. Добре перемішайте та засійте штрихами 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 в стерильні 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 перемішуйте 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 стандарту Мак-Фарланда № 1, повільно доливаючи стерильний розчинник для мікобактерій. Добре струсіть.
 - (9) Перед розміщенням у морозильній камері розлийте аліквоти 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 °C. Перед використанням розведіть до концентрації 10^5 КУО/мл. Добре перемішайте та засійте штрихами тестове середовище, використовуючи калібровану петлю на 0,01 мл.

B. Процедури тестування середовища

1. Засійте показові зразки середовища вказаними нижче культурами мікроорганізмів.
 - a. Перш ніж здійснювати інокуляцію, перевірте, чи поверхні агарів дійсно сухі.
 - b. За допомогою стерильних одноразових каліброваних петель на 0,01 мл інокулюйте тестові контейнери культурами мікобактерій, приготованими описаним вище способом.
 - c. Інкубуйте всі контейнери з нещільно закритими кришками в аеробній атмосфері, збагаченій діоксидом вуглецю, за температури 35 ± 2 °C.
 - d. Візьміть пробірки з попередньо протестованим Middlebrook 7H10 Agar (агаром Міддлбрука 7H10) як контрольні.

- На 7-у, 14-у та 21-у добу (за потреби) перевірте контейнери на наявність росту мікроорганізмів, селективності й пігментації.
- Очікувані результати

Мікроорганізми	АТСС	Виділення
*Mycobacterium tuberculosis H37Ra	25177	Ріст
*Mycobacterium kansasii, група I	12478	Ріст
*Mycobacterium scrofulaceum, група II	19981	Ріст
*Mycobacterium intracellulare, група III	13950	Ріст
*Mycobacterium fortuitum, група IV	6841	Ріст

*Штам мікроорганізму, рекомендований для користувацького контролю якості.

ПРИМІТКА. Матеріали потрібно перевіряти відповідно до положень стандарту CLSI M22-A3.

III ДОДАТКОВИЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Огляньте пробірки або флакони на наявність ознак псування, описаних у розділі «Псування продукту».
- Огляньте репрезентативні пробірки чи флакони, щоб упевнитись у відсутності фізичних дефектів, які можуть завадити використанню.
- Помістіть в інкубатор незасіяні репрезентативні пробірки або флакони за температури 20–25 °C і 30–35 °C. Через 7 діб перевірте їх на наявність мікроорганізмів.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОДУКТ

IV ПРИЗНАЧЕННЯ

Агар Міддлбрука й Кона 7H10 використовується під час виділення й культивування мікобактерій.

V КОРОТКИЙ ОГЛЯД І ОПИС

Для культивації мікобактерій було розроблено багато видів поживних середовищ. Спочатку їх готували на яєчній основі й застосовували середовище Левенштейна – Єнсена, а також середовище Петраньяні. Дюбо та Міддлбрук розробили кілька рецептур із використанням олеїнової кислоти й альбуміну, які сприяли росту бактерій і захищали мікроорганізми від впливу багатьох токсичних речовин. 1 Потім Міддлбрук і Кон покращили рецептуру агару, який тепер сприяв швидшому й інтенсивнішому росту культур *Mycobacterium* у середовищі 7H10.2, 3 Дані досліджень доводили, що для культивації в середовищі 7H10 потрібно менше бактерій, ніж під час використання середовищ на яєчній основі.⁴

VI ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

Агар Міддлбрука й Кона 7H10 містить різноманітні мінеральні солі, які входять до складу речовин, потрібних для росту мікобактерій. Утворена з цитрату натрію лимонна кислота стримує поширення неорганічних катіонів. Гліцерин – багате джерело енергії та вуглецю. Туберкульозні бацили споживають олеїнову кислоту й решту жирних кислот із довгим ланцюгом, які відіграють важливу роль у метаболізмі мікобактерій. Альбумін захищає туберкульозні бацили від токсичних речовин і тому покращує їх відтворення в результаті первинного виділення. Каталаза сприяє розщепленню токсичних пероксидів, які можуть бути в середовищі. Часткову інгібіцію бактерій забезпечує наявність барвника малахітового зеленого.

VII РЕАГЕНТИ

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Приблизний склад* на 1 л очищеної води

Сульфат магнію	0,05 г	Альбумін бичачої сироватки (Fraction V)	5,0 г
Заліза амонійного цитрат	0,04 г	Каталаза	3,0 мг
Цитрат натрію	0,4 г	Піридоксин	1,0 мг
Сульфат амонію	0,5 г	Сульфат цинку	1,0 мг
Глутамат натрію	0,5 г	Сульфат міді	1,0 мг
Фосфат динатрію	1,5 г	Біотин	0,5 мг
Фосфат монокалію	1,5 г	Хлорид кальцію	0,5 мг
Агар	13,5 г	Малахітовий зелений	0,25 мг
Хлорид натрію	0,85 г	Олеїнова кислота	0,06 мл
Декстроza	2,0 г	Гліцерин	5,0 мл

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

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

Пробірки та флакони з тугими кришками слід відкривати обережно, щоб не розбити скло й не поранитись уламками.

Клінічні зразки можуть містити патогенні мікроорганізми, зокрема віруси гепатиту й імунodefіциту людини. Під час маніпуляцій із предметами, контамінованими кров'ю й іншими біологічними рідинами, необхідно дотримуватися нормативів закладу та стандартних запобіжних заходів.⁵⁻⁸ Перш ніж утилізувати підготовані пробірки, контейнери для зразків або інші забруднені матеріали, простерилізуйте їх в автоклаві.

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.⁷

Інструкції зі зберігання. Після отримання зберігайте пробірки та флакони в темряві за температури 2–8 °C. Запобігайте замороженню та перегріванню. Відкривати слід безпосередньо перед використанням. Мінімізуйте вплив світла. Середовища, що зберігаються згідно з вказівками на етикетці, можна використовувати для посіву протягом терміну придатності й інкубувати з дотриманням указанного часу інкубації. Перед посівом температура середовища має зрівнятися з кімнатною.

Псування продукту Не використовуйте пробірки або флакони з видимими ознаками мікробного забруднення, зміни кольору, висихання чи іншими ознаками погіршення якості.

VIII ЗАБІР І ОБРОБКА ЗРАЗКІВ

Придатні для культивування зразки можна обробляти, використовуючи різні методики. Перегляньте відповідні документи, щоб ознайомитися з докладною інформацією.⁹⁻¹¹ Зразки слід збирати до введення протимікробних засобів. Необхідно забезпечити своєчасну доставку в лабораторію.

IX ПРОЦЕДУРА

Матеріал, що входить у комплект. Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

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.

Для первинного виділення зі зразків, що містять мікобактерії, слід використовувати процедури тестування, рекомендовані Центрами з контролю та профілактики захворювань у США (CDC).⁹ Розчин N-ацетил-L-цистеїну та гідроксиду натрію (NALC-NaOH) рекомендовано як м'яку й ефективну розчинну та дезінфекційну речовину. Ці реагенти входять у набір для ферментації та деконтамінації мікобактеріальних зразків **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit. Докладніші інструкції з деконтамінації та культивування наведено у відповідних довідкових матеріалах.⁹⁻¹²

Після інокуляції зберігайте контейнери закритими від світла та помістіть їх у спеціальну систему, яка підтримує аеробну атмосферу, збагачену діоксидом вуглецю. Інкубуйте при температурі $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Інокулят слід засівати в скошені середовища або флакони із середовищем у горизонтальному положенні та до повного адсорбування інокуляту. Протягом перших 3 тижнів пробірки та флакони не слід щільно закривати гвинтовими кришками: щоб ініціювати ріст культури, потрібна циркуляція діоксиду вуглецю. Згодом щільно закрийте кришки, щоб запобігти дегідратації; раз на тиждень на короткий час послабляйте кришку. Якщо бракує місця, установлюйте пробірки вертикально.

ПРИМІТКА. Під час первинного виділення культур із ділянок шкіри, імовірно заражених бактеріями *M. marinum* або *M. ulcerans*, інкубацію потрібно проводити за температури $25\text{--}33^\circ\text{C}$. Оптимальний ріст культур *M. avium* і *M. xenopi* спостерігається за температури $40\text{--}42^\circ\text{C}$.⁹ Дублікат культури потрібно інкубувати за температури $35\text{--}37^\circ\text{C}$.

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

Дотримуйтеся вимог щодо контролю якості відповідно до застосовних місцевих і державних нормативів, вимог до акредитації та стандартних процедур із контролю якості у вашій лабораторії. Для дотримання належних практик контролю якості користувачеві слід ознайомитися з відповідними нормативами Інституту клінічних і лабораторних стандартів (CLSI) і нормативами Покращення роботи клінічних лабораторій (CLIA).

X РЕЗУЛЬТАТИ

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

Нижче вказано, які дані потрібно записати.⁹

- Кількість днів, необхідна для утворення колоній, видимих неозброєним оком. При швидкому рості колонії дозрівають за 7 днів, при повільному зростанні потрібно більше 7 днів для утворення зрілих колоній.
- Кількість колоній (флакони):
 - немає колоній = негативний
 - менше ніж 50 колоній = фактична кількість колоній
 - 50–100 колоній = 1+
 - 100–200 колоній = 2+
 - майже суцільний ріст (200–500) = 3+
 - суцільний ріст (500 колоній або більше) = 4+
- Утворення пігменту:
 - білий, кремовий або темно-жовтий – нехромогенний (HX)
 - лимонний, жовтий, оранжевий, червоний – хромогенний (X)

У зафарбованих зразках можуть спостерігатися кислотостійкі бактерії. До виконання остаточних тестів їх слід указувати лише як «кислотостійкі бактерії».

Під час обстеження з препаративною лупою флакони можна перевернути. Оцініть результати при 10–60-кратному збільшенні з прохідним світлом. Для швидкого огляду на наявність колоній використовуйте 10–20-кратне збільшення. Підвищивши збільшення до 30–60-кратного, можна дослідити морфологію колоній (наприклад, виявити колонії у вигляді змієподібних джгутів).

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.⁹⁻¹²

XII ЕФЕКТИВНІСТЬ

Перед продажем усі партії контейнерів з агаром Міддлбрука й Кона 7H10 проходять перевірку на ефективність. За допомогою каліброваної петлі на 0,01 мл репрезентативні зразки партії висівають штриховим методом разом із культурами, розведеними до концентрації 10^5 колонієутворюючих одиниць (КУО) на 1 мл бактерій *Mycobacterium kansasii* групи I (ATCC 21478), *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 контейнери інкубують із нещільно закритими кришками в аеробній атмосфері, збагаченій діоксидом вуглецю (5–10 %), за температури $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Через 7, 14 днів і 21 день після початку інкубації контейнери перевіряють на наявність росту й пігментації. У всіх культур спостерігається помірний або активний ріст упродовж 21 дня. Пігментація колоній виглядає так: бактерії *M. kansasii* мають кремово-жовте забарвлення, *M. scrofulaceum* – помірно жовте або жовтогаряче, *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* і *M. fortuitum* – кремового кольору.

XIII НАЯВНІСТЬ

№ за

каталогом Опис

220958	Скошене середовище BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants у пробірках розміру А, 10 пробірок в упаковці
220959	Скошене середовище BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants у пробірках розміру А, 100 пробірок у контейнері
297448	Скошене середовище BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants у пробірках розміру С, 10 пробірок в упаковці
297396	Скошене середовище BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants у пробірках розміру С, 100 пробірок у контейнері
297274	Агар BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar у флаконах об'ємом близько 29,6 мл, 100 флаконів у контейнері

XIV ДОВІДКОВІ МАТЕРІАЛИ

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.

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