

BD Middlebrook 7H10 Agar

BRUKSOMRÅDE

BD Middlebrook 7H10 Agar brukes til isolering og dyrking av mykobakterier.

PRINSIPPER FOR OG FORKLARING AV PROSEDYREN

Mikrobiologisk metode.

I løpet av dette århundret er det mange dyrkingsmedier som er utviklet for dyrking av mykobakterier. De tidligste var eggbaserte og omfattet Löwenstein-Jensen-mediet og Petragnani-mediet. Dubos og Middlebrook medvirket til utviklingen av en rekke formuleringer som inneholdt oleinsyre og albumin som nøkkelingredienser for å hjelpe til med vekst av tuberkelbasillen og beskytte organismene mot flere toksiske midler.¹ Følgelig forbedret Dubos og Middlebrook formuleringen av oleinsyre-albumin-agar og oppnådde hurtigere og frodigere vekst av *Mycobacterium*-artene på mediet deres om ble kalt 7H10.^{2,3} Det er rapportert at det tyder på at 7H10-mediet dyrker færre kontaminanter enn det eggbaserte mediet som var i vanlig bruk til dyrking av mykobakterier.⁴

I **BD Middlebrook 7H10 Agar** gir en rekke uorganiske salter stoffer som er essensielle i dyrkingen av mykobakterier. Natriumsitratet, når det omdannes til sitronsyre, fungerer til å beholde visse uorganiske kationer i oppløsningen. Glyserol er en rikholdig kilde av karbon og energi. Oleinsyre samt andre langkjedete fettsyrer kan utnyttes av tuberkelbasillen og spiller en viktig rolle i metabolismen av mykobakterier. Katalase ødelegger toksiske peroksider som kan finnes i mediet. Den primære effekten av albumin er å beskytte tuberkelbasillen mot toksiske midler og forsterker derfor påvisningen ved primærisolering. Delvis hemming av kontaminerende bakterier oppnås ved tilføring av malakitt grønnfarge.

REAGENSER

BD Middlebrook 7H10 Agar

Sammensetning* per liter renset vann

Magnesiumsulfat	0,025 g	Bovint Albumin V	5,0 g
Jernammoniumsitratt	0.04	Katalase	0.004
Natriumsitrat	0.4	Pyridoksin	0.001
Ammoniumsulfat	0.5	Sinksulfat	0.001
Natriumglutamat	0.5	Koppersulfat	0.001
Dinatriumfosfat	1.5	Biotin	0.0005
Monokaliumfosfat	1.5	Kalsiumklorid	0.0005
Agar	17.0	Malakittgrønn	0.00025
Natriumklorid	0.85	Glyserol	5.0
Glukose	2.0	Oleinsyre	0,05 ml

pH 6,6 +/- 0,2

*Justert og/eller supplert etter behov for å oppfylle visse funksjonskriterier.

FORSIKTIGHETSREGLER

IVD. Kun til profesjonelt bruk. 

Skålene må ikke anvendes dersom de viser tegn på mikrobiell kontaminering, misfarging, uttørking, sprekkdannelse eller har andre tegn til forringelse.

Se dokumentet **GENERELL BRUKSANVISNING** for informasjon om aseptiske håndteringsprosedyrer, biologiske farer og avhending av brukte produkter.

Laboratorieprosedyrer om omfatter mykobakterier krever spesialutstyr og teknikker for å minimere biologiske farer.⁵⁻⁷ Biosikkerhetsnivå 3 kreves for håndtering av prøver og kulturer.

OPPBEVARING OG HOLDBARHET

Agarskålene oppbevares etter mottak i originalinnpakningen på et mørkt sted med temperatur fra 2 til 8 °C, inntil de skal brukes. Unngå frost og overoppheting. Agarskålene kan inokuleres frem til utløpsdatoen (se etiketten på pakken) og inkuberes i de anbefalte inkubasjonsperiodene. Agarskåler fra åpnete stabler på 10 skåler kan brukes i én uke når de oppbevares på et rent sted med temperatur på 2 til 8 °C.

KVALITETSKONTROLL FOR BRUKERE

Inokuler representative prøver med følgende stammer (se dokumentet **GENERELL BRUKSANVISNING** for detaljer). Inkuber ved 35 ± 2 °C aerobt eller i en aerob atmosfære med tilført karbondioksid.

Stamme	Inkubering	Resultat
<i>Mykobakteriumtuberkulose</i> H37Ra ATCC 25177	2 til 3 uker	God til fremragende vekst
<i>Mycobacterium fortuitum</i> DSM 46621	2 til 3 uker	God til fremragende vekst
<i>Mycobacterium smegmatis</i> DSM 43061	2 til 5 dager	God til fremragende vekst
<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	2 til 3 uker	Ganske god til fremragende vekst
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2 til 5 dager	Hemmet
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2 til 5 dager	Hemmet
Ikke-inokulert	Ravgul, litt grønnaktig farge	

PROSEDYRE

Materialer som følger med

BD Middlebrook 7H10 Agar (90 mm **Stacker**-skåler). Mikrobiologisk kontrollert.

Materialer som ikke følger med

Supplerende vekstmedier, reagenser og laboratorieutstyr etter behov.

Prøvetyper

Dette mediet skal brukes til isolering og dyrking av mykobakterier fra kliniske prøver og kan også brukes til dyrking av mykobakterier i spesielle tester (for eksempel i testing av desinfeksjonsmidler mot mykobakterier).

For detaljer om passende prøver, se i referansene.⁶⁻¹⁰

Testprosedyre

Testprosedyrene er de anbefalte fra Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for primær isolering fra prøver som inneholder mykobakterier. N-acetyl-L-cysteine-natriumhydroksid (NALC-NaOH)-oppløsning anbefales som et skånsomt, men effektivt preparerings- og dekontamineringsmiddel. For detaljerte instruksjoner om fremgangsmåter ved dekontaminasjons og dyrking, se i referansene.⁴⁻¹⁰

Etter inokulering skal skålene beskyttes mot lys og plasseres med mediumsiden ned i et **BD GasPak**-glass som drives av **GasPak** karbondioksidgeneratorkonvolutt til engangsbruk eller et annet egnet system som gir en aerob atmosfære beriket med karbondioksid.

Inkuber ved 35 ± 2 °C. Unngå uttørring av mediet under inkubering.

Merk! Kulturer fra lesjoner i hud og bløtvev som mistenkes å inneholde *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, eller andre arter med lavere optimale veksttemperaturer må inkuberes ved 25 til 33 °C. Inkuber en duplikatkultur ved 35 til 37 °C.^{5,9}

Resultater

Skålene kan avleses innen 5 til 7 dager etter inokulering og deretter en gang i uken i opp til 8 uker. Se referansene⁶⁻¹⁰ for detaljer om koloni-morfologi og pigmentering og inkubering.

For avlesing av skåler, vend skålene på platen på et disseksjonsmikroskop. Avles ved 10-60x forstørrelse med transmittert lys. Ta et raskt overblikk ved 10-20x for å se om det finnes kolonier. Større forstørrelse (30-60x) gjør det lettere å observere kolonimorfologi, for eksempel slangelignende og strengeformete kolonier.

Registrer følgende observasjoner:^{5,6}

1. Antall dager som var nødvendige for at koloniene skulle bli makroskopisk synlige.
2. Antall kolonier:
 - Ingen kolonier = negativ
 - Mindre enn 50 kolonier = registrer faktisk antall
 - 50-100 kolonier = 1+
 - 100-200 kolonier = 2+
 - Nesten konfluerende (200–500) = 3+
 - Konfluerende (mer enn 500) = 4+
3. Pigmentproduksjon
 - Hvit, kremfarget eller brungul = ikke-kromogen (NC)
 - Sitronfarget, gul, oransje, rød = kromogen (Ch)

Fargede utstryk vil vise syrefaste basiller som rapporteres bare som "syrefaste baciller" med mindre definitive tester utføres. Se i de aktuelle referanser etter informasjon om videre differensialtester og om prosedyrer for fullstendig identifikasjon av de isolerte organismene.⁴⁻¹⁰

FUNKSJONSDATA OG PROSEDYREBEGRENSNINGER

BD Middlebrook 7H10 Agar er et av standardmediene for isolering og dyrking av mykobakterier fra kliniske prøver.^{4,6,7-11}

Siden dette mediet bare er delvis selektivt kan andre bakterier enn mykobakterier vokse hvis prøvene ikke er ordentlig forhåndsbehandlet mot dekontaminering.^{6,7,9,10}

Negative kulturer utelukker ikke aktiv mykobakteriell infeksjon. Av hensyn til god praksis bør flere forskjellige mediumsformler (faste og flytende) inokuleres.⁶⁻¹⁰

REFERANSER

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. 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. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
6. Sommers, H.M., and J.K. McClatchy. 1983. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., J.A. Morello. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Kuchler, R., et al. 1998. Tuberkulose - Mycobacteriose. *In: Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gatermann (ed.). MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*, vol. 5. Urban & Fischer, Munich, Germany.
8. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
9. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. DIN 58943. 1996. Diagnosis of tuberculosis. Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods. Beuth Verlag, Berlin.
11. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost, Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

FORPAKNING/TILGJENGELIGHET

BD Middlebrook 7H10 Agar

Kat.nr. 254520

Ferdiglagde agarskåler, 20 stk.

Kat.nr. 254521

Ferdiglagde agarskåler, 120 stk.

FLERE OPPLYSNINGER

Ta kontakt med din lokale BD-representant for mer informasjon.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD