

KVALITETSKONTROLPROCEDURER**I INDLEDNING**

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar er et dyrkningsmedium til isolering og dyrkning af mycobakterier.

II PROCEDURE FOR FUNKTIONSTEST**A. Procedure for præparation af inokulater**

1. Inokuler Lowenstein-Jensen-medium i skråagar med stamkulturer af de pågældende mycobakteriestammer ved hjælp af sterile inokuleringspinde.
2. Inkuber rør med løsnede låg i aerob atmosfære tilsat kuldioxid ved 35 ± 2 °C, indtil der opnås kraftig vækst (sædvanligvis inden for 2 – 3 uger).
3. Høst kolonimassen med en steril, skærpet applikatorpind ved forsigtigt at fjerne cellerne fra overfladen af mediet, uden at dyrkningsmedium skræbes af sammen med kolonimassen.
 - a. Ved *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Overfør kolonimassen til et sterilt rør med skruelåg indeholdende sterile glasperler og 5,0 mL Middlebrook 7H9-bouillon med glycerol.
 - (2) Vortex røret omhyggeligt (i flere minutter), indtil suspensionen er fri for store klumper.
 - (3) Sammenlign suspensionen med en McFarland-nefelometerstandard #1. Suspensionen skal være mere uklar end standarden.
 - (4) Lad glasset stå i stativ i 2 – 3 h ved rumtemperatur, for at større partikler kan bundfældes.
 - (5) Overfør supernatanten til en steril beholder.
 - (6) Juster suspensionens uklarhed, til den svarer til McFarland-standard #1, ved langsomt at tilsætte steril Middlebrook 7H9-bouillon med glycerol. Omryst grundigt.
 - (7) Fortynd til 10^5 CFU/mL før brug. Bland suspensionen godt, og inokuler den på testmediet ved strygning med en 0,01 mL kalibreret pødepind med øje.
 - b. Ved alle andre mycobakteriestammer:
 - (1) Overfør kolonimassen til et sterilt 50 mL centrifugerør med skruelåg, indeholdende 8 – 12 sterile glasperler (diameter 2 mm) og 5 mL fortyndingsmedium til mycobakterier, fremstillet på følgende måde:
 - Bland følgende ingredienser i en 1-liters kolbe, og juster pH til 6,7 – 7,0 med 1N natriumhydroxid:
Bovint albumin (fedtsyrefrit) 1,0 g
Polysorbat 80 0,1 mL
Renset vand 500 mL
 - Steriliser ved membranfiltrering (0,2 µ filter).
 - Overfør aseptisk i mængder a 5,5 mL til sterile rør med skruelåg.
 - (2) Benyt en applikatorpind til at emulgere kolonimassen af mycobakterier på sidevæggen af et centrifugerør med skruelåg. Bland kolonimassen med fortyndingsmediet.
 - (3) Sæt låget på røret, og vortex det i ca. 10 minutter, til kolonimassen er godt opslæmmet og fri for store klumper.
 - (4) Tilsæt 15 mL steril fortyndingsvæske til mycobakterier, og bland grundigt.
 - (5) Sammenlign suspensionen med en McFarland-nefelometerstandard #1. Suspensionen skal være mere uklar end standarden.
 - (6) Lad glasset stå i stativ i 2 – 3 h ved rumtemperatur, for at større partikler kan bundfældes.
 - (7) Aspirer supernatanten, og overfør den til en steril beholder. Suspensionen skal være mere uklar end en McFarland-standard #1 og fri for store partikler. Er der store partikler tilstede, skal suspensionen blandes og derefter henstå i yderligere en time. Overfør supernatanten til en steril beholder.
 - (8) Juster suspensionens uklarhed, så den svarer til McFarland-standard #1, ved langsomt at tilsætte sterilt fortyndingsmedium til mycobakterier. Omryst grundigt.
 - (9) Overfør alikvoter af suspensionen til kryo-hætteglas, der er mærket med organismernes identitet og fremstillingsdatoen.
 - (10) Frys suspensionerne ved at stille hætteglassene i en lavtemperaturfryser ved -60 °C. Hætteglassene kan opbevares i indtil seks måneder.
 - (11) Tag det frosne hætteglas ud af fryseren, når suspensionen skal bruges, og optø indholdet i vandbad ved 30 – 35 °C. Fortynd til 10^5 CFU/mL før brug. Bland suspensionen godt, og inokuler den på testmediet ved strygning med en 0,01 mL kalibreret pødepind med øje.

B. Procedurer for testning af medium

1. Inokuler repræsentative prøver med de nedenfor angivne kulturer.
 - a. Sørg for, at agaroverfladerne er frie for fugt inden podning.
 - b. Inokuler testbeholdere med de mycobakteriekulturer, der er fremstillet som beskrevet ovenfor, ved hjælp af kalibrerede, sterile 0,01 mL engangspodenåle med øje.
 - c. Inkuber alle beholdere med løstsiddende låg ved $35 \pm 2^\circ\text{C}$ i aerob atmosfære suppleret med kuldioxid.
 - d. Inkluder rør med tidligere testet Middlebrook 7H10 Agar som kontroller.
2. Undersøg beholdere efter 7, 14 og om nødvendigt 21 dage for vækst, selektivitet og pigmentering.
3. Forventede resultater

Organismer	ATCC	Isolering
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Vækst
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , gruppe I	12478	Vækst
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , gruppe II	19981	Vækst
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , gruppe III	13950	Vækst
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , gruppe IV	6841	Vækst

*Anbefalet organismestamme til bruger kvalitetskontrol.

BEMÆRK! Skal monitoreres af brugeren i overensstemmelse med CLSI M22-A3.

III YDERLIGERE KVALITETSKONTROL

1. Undersøg rør eller flasker som beskrevet under "Produktforringelse".
2. Undersøg repræsentative rør eller flasker visuelt for at sikre, at eventuelle eksisterende fysiske defekter ikke vil påvirke anvendelsen.
3. Inkuber ikke-inokulerede repræsentative rør eller flasker ved $20 - 25^\circ\text{C}$ og $30 - 35^\circ\text{C}$, og undersøg for mikrobiel kontaminering efter 7 dage.

PRODUKTOPLYSNINGER

IV TILSIGTET BRUG

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar bruges i forbindelse med kvalitative procedurer til isolering og dyrkning af mycobakterier.

V RESUMÉ OG FORKLARING

Der er i tidens løb blevet udviklet en række forskellige medier til dyrkning af mycobakterier. De første formuleringer var æg-baserede, bl.a. Lowenstein-Jensen medium og Petragnani medium. Dubos og Middlebrook spillede en vigtig rolle i udviklingen af mange formuleringer, som indeholdt oleinsyre og albumin som vigtigste ingredienser til at facilitere vækst af tuberkelbaciller samt til at beskytte organismene mod forskellige toksiske stoffer.¹ Derefter forbedrede Middlebrook og Cohn formuleringen af oleinsyre-albumin-agar og fandt frem til en hurtigere og mere frodig vækst af *Mycobacterium*-arter på deres medium, der blev kaldt 7H10.^{2,3} Det er blevet rapporteret, at 7H10-mediet har en tendens til at dyrke færre kontaminanter end det æg-baserede medium, der ofte anvendes til dyrkning af mycobakterier.⁴

VI PROCEDURENS PRINCIPPER

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar indeholder en række uorganiske salte, som tilfører substanser, der er kritiske for mycobakteriers vækst. Når natriumcitrat omdannes til citronsyre, fastholder det visse uorganiske kationer i en opløsning. Glycerol udgør en rig kulstof- og energikilde. Oleinsyre såvel som andre lange kæder af fedtsyrer kan bruges af tuberkelbaciller og spiller en vigtig rolle i mycobakteriers stofskifte. Albuminets vigtigste rolle er at beskytte tuberkelbaciller mod giftstoffer, og således forbedrer albuminet bacillernes restitution ved primær isolering. Catalase nedbryder de giftige peroxider, som kan være til stede i mediet. Delvis bakteriehæmning opnås, hvis malachit grønt farvestof er til stede.

VII REAGENSER

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Omtrentlig formel* pr. liter rensset vand

Magnesiumsulfat	0,05 g	Oksealbumin (Fraktion V)	5,0 g
Jernammoniumcitrat	0,04 g	Catalase	3,0 mg
Natriumcitrat	0,4 g	Pyridoxin	1,0 mg
Ammoniumsulfat	0,5 g	Zinksulfat	1,0 mg
Mononatriumglutaminat	0,5 g	Kobbersulfat	1,0 mg
Dinatriumphosphat	1,5 g	Biotin	0,5 mg
Monokaliumfosfat	1,5 g	Calciumchlorid	0,5 mg
Agar	13,5 g	Malachitgrønt	0,25 mg
Natriumchlorid	0,85 g	Oleinsyre	0,06 mL
Dextrose	2,0 g	Glycerin	5,0 mL

*Justeret og/eller suppleret som påkrævet for at opfylde funktionskriterier.

Advarsler og forholdsregler: Til *in vitro*-diagnostik.

Rør og glas med stramme låg skal åbnes forsigtigt for at undgå personskade fra knust glas.

Patogene mikroorganismer, herunder hepatitisvirus og human immundefekt virus (HIV), kan være til stede i kliniske præparater. "Standard forholdsregler"⁵⁻⁸ og institutionelle retningslinjer skal følges ved håndteringen af alle materialer, der er kontamineret med blod og andre legemsvæsker. Inden de kasseres, skal de præparerede rør, prøvebeholdere og andre kontaminede materialer steriliseres ved autoklavering.

Ved ikke-aerosolfrembringende håndtering af kliniske prøver, således fremstilling af udstrygningspræparater af syrefaste organismer, skal praksis og procedurer samt indeslutningsudstyr og -faciliteter være i overensstemmelse med biosikkerhedsniveau 2. Alt aerosolfrembringende arbejde skal udføres i biologisk sikkerhedskabinet af klasse I eller II. Biosikkerhedsniveau 3-praksis, opbevaringsudstyr og -faciliteter er påkrævet i forbindelse med laboratorieaktiviteter, der involverer formering og håndtering af kulturer af *M. tuberculosis* og *M. bovis*. Dyreundersøgelser kræver også specielle procedurer.⁷

Opbevaringsinstruktioner: Efter modtagelse opbevares rør og flasker i mørke ved 2 – 8 °C. Undgå nedfrysning og overophedning. Må ikke åbnes inden brugstidspunktet. Minimer udsættelsen for lys. Medier, der har været opbevaret i henhold til anvisningerne på etiketten indtil umiddelbart inden brug, kan inokuleres frem til udløbsdatoen og inkuberes i de anbefalede inkubationstidsrum. Lad mediet opnå stuetemperatur inden inokulering.

Produktnedbrydning: Anvend ikke rør eller flasker, hvis de frembyder tegn på mikrobiel kontaminering, misfarvning, udtørring eller andet, der tyder på forringelse.

VIII PRØVEINDSAMLING OG -HÅNDTERING

Præparater, der er egnet til dyrkning, kan håndteres med forskellige teknikker. Læs relevante tekster for at få detaljerede oplysninger.⁹⁻¹¹ Præparaterne skal være opsamlet, inden der indgives antimikrobielle stoffer. Sørg for omgående levering til laboratoriet.

IX PROCEDURE

Vedlagte materialer: Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Nødvendige, ikke vedlagte materialer: Hjælpedyrkningsmedier, reagenser, organismer til kvalitetskontrol og nødvendigt laboratorieudstyr.

Testprocedure: Overhold aseptisk teknik.

De angivne testprocedurer er dem, der anbefales af Centers for Disease Control (CDC) til primær isolering fra prøver indeholdende mycobakterier.⁹ En opløsning af N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid (NALC-NaOH) anbefales som et mildt, men effektivt opløsende og dekontaminerende middel. De nævnte reagenser er indeholdt i **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/ Decontamination Kit. Der henvises til passende litteratur⁹⁻¹² vedrørende detaljerede anvisninger til dekontaminering og dyrkning.

Efter inokulering skal beholderne anbringes beskyttet mod lys i et egnet system, der opretholder aerob atmosfære beriget med kuldioxid. Inkuber ved 35 ± 2 °C.

Skråagar og medier på flaske skal inokuleres vandret, indtil inokulatet er absorberet. Rør og flasker skal i de første 3 uger have løstsiddende låg for at give mulighed for tilførsel af kuldioxid til igangsættelse af væksten. Skru derefter lågene til for at forhindre dehydrering; løsn lågene kortvarigt en gang om ugen. Anbring rørene stående i tilfælde af pladsproblemer.

BEMÆRK! Kulturer fra hudlæsioner, der formodes at indeholde *M. marinum* eller *M. ulcerans*, skal inkuberes ved 25 – 33 °C til primær isolation. Kulturer, der udviser optimal vækst ved 40 – 42 °C, kan indeholde *M. avium* eller *M. xenopi*.⁹ Inkuber et ekstra eksemplar af kulturen ved 35 – 37 °C.

Bruger kvalitetskontrol: Se "Kvalitetskontrolprocedurer".

Kvalitetskontrol skal udføres i overensstemmelse med gældende lokale og/eller nationale regulativer eller akkrediteringskrav samt laboratoriets standardkvalitetskontrolprocedurer. Det anbefales at læse de relevante CLSI-retningslinjer og CLIA-regulativer mht. relevante procedurer for kvalitetskontrol.

X RESULTATER

Inspicer kulturerne inden for 5 – 7 dage efter inokulering og derefter én gang om ugen i op til 8 uger.

Noter observationer:⁹

1. Antal dage, der kræves, før kolonierne er makroskopisk synlige. Hurtigtvoksende organismer danner modne kolonier inden for 7 dage; langsomtvoksende organismer kræver over 7 dage til at danne modne kolonier.
2. Antal kolonier (flasker):
Ingen kolonier = negativ
Færre end 50 kolonier = aktuelle tælling
50 – 100 kolonier = 1+
100 – 200 kolonier = 2+
Næsten konfluente (200 – 500) = 3+
Konfluente (over 500) = 4+
3. Pigmentproduktion:
Hvid, flødefarvet eller gulbrun = ikke-kromogen (NC)
Citrongul, gul, orange, rød = kromogen (Ch)

I farvede udstrygningspræparater kan der være syrebestandige baciller, der imidlertid ikke beskrives som "syrebestandige baciller", medmindre der udføres definitive tests.

Flasker kan undersøges ved at vende dem om på objektbordet under et dissektionsmikroskop. Aflæs ved 10 – 60x med gennemfaldende lys. Gennemse hurtigt flaskerne ved 10 – 20x for tilstedeværelse af kolonier. Ved stærkere forstørrelse (30 – 60x) kan man bedre iagttage kolonimorfologien, dvs. slyngede trådlignende kolonier.

XI PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Organismer skal være i ren dyrkning, så de kan identificeres. Der bør foretages morfologiske, biokemiske og/eller serologiske test for at få en endelig identifikation. Læs de relevante tekster for detaljerede oplysninger og anbefalede procedurer.⁹⁻¹²

XII FUNKTIONSDATA

Inden frigivelse testes alle partier af Middlebrook and Cohn 7H10 Agar-beholdere for funktionsdata. Ved hjælp af en 0,01 mL kalibreret løkke udstryges-inokuleres repræsentative prøver af partiet med kulturer, der er fortyndet til at indeholde 10^5 kolonidannende enheder (CFU) pr. mL *Mycobacterium kansasii* gruppe I (ATCC 21478), *M. scrofulaceum* gruppe II (ATCC 19981), *M. intracellulare* gruppe III (ATCC 13950), *M. fortuitum* gruppe IV (ATCC 6841) og *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Efter inokulering inkuberes beholderne med løsnede hætter ved 35 ± 2 °C i en atmosfære, der er beriget med 5 – 10 % kuldioxid. Beholderne er klar til vækst og pigmentering efter 7, 14 og 21 dages inkubation. Alle organismer udviser moderat til kraftig vækst inden for 21 dage. Kolonipigmentering er som følger: *M. kansasii* er hvid til cremegul; *M. scrofulaceum* er medium gul til orange; *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* og *M. fortuitum* er cremefarvede.

XIII BESTILLING

Kat. nr.	Beskrivelse
220958	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, pakke med 10 rør, str. A
220959	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, karton med 100 rør, str. A
297448	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, pakke med 10 rør, str. C
297396	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, karton med 100 rør, str. C
297274	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, 1 oz.-flasker, karton med 100

XIV LITTERATUR

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.

BD Diagnostics Teknisk service og support: skal De kontakte den lokale BD repræsentant eller besøg 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