

BD Middlebrook 7H10 Agar

TILSIGTET BRUG

BD Middlebrook 7H10 Agar anvendes til isolering og dyrkning af mykobakterier.

PROCEDURENS PRINCIPPER OG FORKLARING

Mikrobiologisk metode.

Mange kulturmedier er blevet udtænkt til dyrkning af mykobakterier gennem de sidste hundrede år. De tidlige medier var ægbaserede formuleringer og inkluderede Löwenstein-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 organismerne 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 mykobakterier.⁴

Forskellige uorganiske salte i **BD Middlebrook 7H10 Agar** giver substanser, der er essentielle for væksten af mykobakterier. Natriumcitrat har det formål, når det konverteres til citronsyre, at holde visse uorganiske kationer i opløsningen. Glycerin er en rig kilde til kulstof og energi. Oleinsyre, såvel som andre lange kæder af fedtsyrer, kan bruges af tuberkelbaciller og spiller en vigtig rolle i mykobakteriers stofskifte. Catalase nedbryder de giftige peroxider, der måtte være i mediet. Albumins vigtigste effekt er at beskytte tuberkelbaciller mod toksiske stoffer, og det forbedrer derfor bacillernes restitution ved primær isolering. Delvis hæmning af kontaminerende bakterier opnås ved tilstedeværelsen af malakitgrønt farvestof.

REAGENSER

BD Middlebrook 7H10 Agar

Formel* pr. liter rensset vand

Magnesiumsulfat	0,025 g	Bovint albumin V	5,0 g
Jern-ammoniumcitrat	0,04	Catalase	0,004
Natriumcitrat	0,4	Pyridoxin	0,001
Ammoniumsulfat	0,5	Zinksulfat	0,001
Mononatriumglutamat	0,5	Kobbersulfat	0,001
Dinatriumfosfat	1,5	Biotin	0,0005
Monokaliumfosfat	1,5	Kalciumklorid	0,0005
Agar	17,0	Malakitgrøn	0,00025
Natriumklorid	0,85	Glycerin	5,0
Glukose	2,0	Oleinsyre	0,05 mL

pH 6,6 ± 0,2

* Justeret og/eller suppleret som påkrævet for at leve op til funktionskriterier.

FORHOLDSREGLER

IVD . Kun til professionel brug. 

Pladerne må ikke anvendes, hvis de viser tegn på mikrobiel kontaminering, misfarvning, udtørring, brud eller andre tegn på forringelse.

Læs dokumentet **GENEREL BRUGSANVISNING** for procedurer om aseptisk håndtering, biologisk risiko og bortskaffelse af det brugte produkt.

Laboratorieprocedurer, der involverer mykobakterier, kræver specielt udstyr og teknikker for at mindske biologiske risici.⁵⁻⁷ Biosikkerhedsniveau 3 kræves for håndtering af prøver og kulturer.

OPBEVARING OG HOLDBARHED

Pladerne opbevares efter modtagelse i mørke ved 2 – 8 °C i deres originale hylsterindpakning, lige indtil de skal bruges. Undgå nedfrysning og overophedning. Pladerne kan inokuleres op til udløbsdatoen (se etiketten på pakken) og inkuberes i de anbefalede inkubationstider. Plader fra åbnede stabler med 10 plader kan bruges i en uge, når de opbevares i et rent område ved 2 – 8 °C.

BRUGERKVALITETSKONTROL

Repræsentative prøver inokuleres med følgende stammer (yderligere oplysninger findes i dokumentet **GENEREL BRUGSANVISNING**). Pladerne inkuberes ved 35 +/- 2 °C i en aerob atmosfære suppleret med kuldioxid.

Stamme	Inkubation:	Resultat
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	2-3 uger	Vækst er god til fortræffelig
<i>Mycobacterium fortuitum</i> DSM 46621	2-3 uger	Vækst er god til fortræffelig
<i>Mycobacterium smegmatis</i> DSM 43061	2-5 dage	Vækst er god til fortræffelig
<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	2-3 uger	Vækst er udmærket til fortræffelig
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2-5 dage	Hæmmet
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2-5 dage	Hæmmet
Ikke-inokuleret	Ravgul, ganske let grønlig nuance	

PROCEDURE

Vedlagte materialer

BD Middlebrook 7H10 Agar (90 mm **Stacker** plates). Mikrobiologisk kontrolleret.

Materialer, der ikke er vedlagt

Hjælpedyrkningsmedier, reagenser og laboratorieudstyr som påkrævet.

Prøvetyper

Dette medium anvendes til isolering og dyrkning af mykobakterier fra kliniske prøver og kan også anvendes til dyrkning af mykobakterier i specielle analyser (f.eks til analyse af desinfektionsmidler mod mykobakterier).

Se referencematerialet for yderligere oplysninger om egnede prøver.⁶⁻¹⁰

Testprocedure

Testprocedurerne er dem, der anbefales af Centers for Disease Control and Prevention (CDC) til primær isolering af prøver, der indeholder mykobakterier. N-acetyl-L-cysteine-natriumhydroxid (NALC-NaOH) opløsning anbefales som mildt men effektivt fordøjelses- og dekontaminerende stof. Se referencematerialet for yderligere oplysninger om dekontaminering og dyrkningsmetoder.⁴⁻¹⁰

Efter inokulering holdes pladerne beskyttet mod lys og placeres med mediesiden nedad i et **BD GasPak** glas, der betjenes med en **GasPak** engangskonvolut til generering af kuldioxid CO₂, eller et andet egnet system, der giver en aerob atmosfære beriget med kuldioxid. Inkubér ved 35 ± 2 °C. Undgå, at mediet udtørre under inkubation.

Bemærk: Kulturer fra læsioner på hud og bløddele, der menes at indeholde *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, eller andre arter med en lavere maksimal temperaturgrænse, skal inkuberes ved 25 – 33 °C. Inkubér en dublet af kulturen ved 35 – 37 °C.^{5,9}

Resultater

Pladerne kan aflæses indenfor 5-7 dage efter inokulation og derefter en gang om ugen i op til 8 uger. Se referencematerialet for oplysninger om kolonimorfologi og -pigmentering.⁶⁻¹⁰

For at aflæse pladerne, inverteres de på platformen på et dissektionsmikroskop. Aflæs ved 10-60x forstørrelse med transmitteret lys. Skan hurtigt ved 10-20x for tilstedeværelse af kolonier. Højere forstørrelse (30-60x) kan hjælpe ved observation af kolonimorfologi, dvs. slangeformede kolonier.

Notér følgende observationer:^{5,6}

1. Antal dage, der er påkrævet, for at kolonierne bliver makroskopisk synlige.

2. Antal kolonier:

Ingen kolonier = negativ

Færre end 50 kolonier = notér den faktiske tælling

50-100 kolonier = 1+

100-200 kolonier = 2+

Næsten konfluent (200-500) = 3+

Konfluent (mere end 500) = 4+

3. Pigmentproduktion

Hvid, cremefarvet eller brungul = ikke-kromogen (NC)

Lemon, gul, orange, rød = kromogen (Ch)

Farvede udstrygninger vil udvise syrefaste baciller, som kun noteres som "syrefaste baciller", medmindre der udføres definitive analyser. Se referencematerialet for oplysninger om andre differentiale analyser og procedurer til fuldstændig identifikation af de isolerede organismer.⁴⁻¹⁰

FUNKTIONSDATA OG PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

BD Middlebrook 7H10 Agar er et af standardagarmedierne til isolering og dyrkning af mykobakterier fra kliniske prøver.^{4,6,7-11}

Da dette medium kun er delvist selektivt, kan andre bakterier end mykobakterier vokse på det, hvis prøver ikke er forbehandlet korrekt mht. dekontaminering.^{6,7,9,10}

Negative kulturer udelukker ikke aktiv infektion med mykobakterier. I henhold til god praksis bør flere forskellige medieformler (faste og flydende) inokuleres.⁶⁻¹⁰

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, 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. Küchler, R., et al. 1998. Tuberkulose - Mycobacteriose. *In: Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gattermann (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. Tenover (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. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

EMBALLERING/BESTILLING

BD Middlebrook 7H10 Agar

Kat. nr. 254520 Plademedier klar til brug, 20 plader

Kat. nr. 254521 Plademedier klar til brug, 120 plader

YTTERLIGARE INFORMATION

Kontakta närmaste BD-representant för ytterligare information.



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 the property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD