

Middlebrook 7H10//7H10 Agar
Middlebrook 7H11//7H11 Selective Agar
Middlebrook 7H10//7H11 Selective Agar**USO PREVISTO**

Questi terreni sono usati in procedure qualitative per l'isolamento selettivo e la coltivazione di micobatteri, in particolare *Mycobacterium tuberculosis*, da campioni clinici e non clinici.

Le piastre Middlebrook 7H10//7H10 Agar **I Plate**, a due settori, contengono un terreno suddiviso in due settori per permettere l'inoculo di due campioni.

Le piastre doppie Middlebrook 7H11//7H11 Selective Agar forniscono due terreni, uno moderatamente selettivo e uno altamente selettivo, per il recupero di micobatteri da campioni contenenti flora mista. Il terreno Middlebrook 7H11 Agar è contenuto nel settore contraddistinto dal numero romano "I", inciso sul fondo del settore stesso, mentre il terreno 7H11 Selective Agar è contenuto nel settore contrassegnato con "II."

Le piastre doppie Middlebrook 7H10//7H11 Selective Agar forniscono due terreni, uno moderatamente selettivo e uno altamente selettivo. Il terreno Middlebrook 7H10 Agar è contenuto nel settore contraddistinto dal numero "I", inciso sul fondo del settore stesso, mentre il terreno 7H11 Selective Agar è contenuto nel settore contrassegnato con "II."

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il terreno Middlebrook 7H10 Agar si basa su una formulazione migliorata dell'agar acido oleico-albumina sviluppato da Middlebrook e Cohn per favorire la crescita precoce di bacilli tubercolari *in vitro* e facilitare una più ampia applicazione dei test di sensibilità agli antibiotici.¹⁻³ Data la formulazione chimica relativamente semplice, ha minori probabilità di agevolare la crescita di agenti contaminanti rispetto ai terreni a base d'uovo comunemente usati per la coltivazione di micobatteri.⁴

Il terreno Middlebrook 7H11 Agar è stato sviluppato da Cohn et al. aggiungendo idrolisato di caseina dall'agar 7H10.⁵ L'agar 7H11 Agar offre una migliore crescita di ceppi esigenti farmaco-resistenti di *M. tuberculosis* che evidenziano una crescita mediocre (o del tutto assente) sull'agar 7H10 o su altri terreni ampiamente usati.^{5,6}

Il terreno 7H11 Selective Agar è un agar 7H11 modificato dall'aggiunta di quattro antibiotici: polimixina B, carbenicillina, amfotericina B e trimetoprim lattato. Mitchison et al. hanno inizialmente sviluppato il terreno per ridurre l'esigenza di procedure di decontaminazione,⁷ riscontrando la capacità degli agenti alcalini usati per diminuire la crescita di microrganismi contaminanti, di inibire alcune specie di micobatteri. McClatchy ha raccomandato la riduzione della concentrazione di carbenicillina usata da Mitchinson et al. per diminuire la capacità del terreno di inibire i micobatteri.⁸

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Middlebrook 7H10 Agar è un terreno definito costituito da arricchimento acido oleico-albumina, glicerolo, destrosio e composti inorganici per fornire le sostanze nutritive necessarie a supportare la crescita di specie micobatteriche. La catalasi distrugge i perossidi tossici eventualmente presenti nel terreno. La parziale inibizione dei batteri si ottiene grazie alle proprietà inibenti del verde malachite.

Il terreno Middlebrook 7H11 Agar è costituito da agar 7H10 supplementato con digerito pancreatico di caseina per migliorare la crescita di ceppi esigenti di *M. tuberculosis*.

L'aggiunta di antibiotici all'agar 7H11 migliora il recupero di micobatteri dai campioni contenenti flora mista.⁶ La polimixina B è un antibiotico polipeptidico che inibisce selettivamente la maggior parte dei bacilli gram-negativi, incluso *Pseudomonas*, ma non le specie *Proteus*.⁹ La carbenicillina è una penicillina semisintetica efficace contro batteri gram-positivi e gram-negativi, inclusi ceppi di *Escherichia coli* resistenti ad altri antibiotici.⁹ L'amfotericina B è un antibiotico antimicotico e il trimetoprim lattato è un antibiotico sintetico che inibisce batteri sia gram-positivi sia gram-negativi, incluse le specie *Proteus*.

REAGENTI

Agar Middlebrook 7H10

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Solfato di magnesio.....	0,05	g
Citrato ferrico di ammonio.....	0,04	g
Citrato di sodio	0,4	g
Ammonio Solfato	0,5	g
Glutammato monosodico	0,5	g
Fosfato disodico.....	1,5	g
Fosfato monopotassico	1,5	g
Agar	13,5	g
Piridossina	1,0	mg
Solfato di zinco	1,0	mg
Solfato di rame	1,0	mg
Biotina	0,5	mg
Cloruro di calcio.....	0,5	mg
Verde malachite.....	0,25	mg
Arricchimento OADC.....	100,0	mL
Glicerolo	5,0	mL

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Arricchimento OADC

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Cloruro di sodio	8,5	g
Albumina bovina (frazione V)....	50,0	g
Destrosio	20,0	g
Catalasi	0,03	g
Acido oleico.....	0,6	mL

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Il terreno **Middlebrook 7H11 Agar** è un Middlebrook 7H10 Agar modificato dall'aggiunta di 1,0 g/L di digerito pancreatico di caseina.

Il terreno **7H11 Selective Agar** è un Middlebrook 7H11 Agar con l'aggiunta degli antibiotici seguenti per litro:

Polimixina B	200.000	unità
Carbenicillina	50,0	mg
Amfotericina B.	10,0	mg
Trimetoprim lattato	20,0	mg

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*

Se si riscontra un'umidità eccessiva, capovolgere il fondo su un coperchio e lasciare asciugare all'aria per evitare la formazione di aderenze tra la parte superiore e inferiore della piastra durante l'incubazione.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".¹⁰⁻¹³ Prima dello smaltimento, sterilizzare in autoclave le piastre preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Per le manipolazioni di campioni clinici (es. preparazione di strisci acido-resistenti) che non comportano produzione di aerosol, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 2. Tutte le procedure che comportano la generazione di aerosol devono essere eseguite sotto cappa di sicurezza biologica di Classe I o II. Per le attività di laboratorio che comportano la propagazione e manipolazione di colture di *M. tuberculosis* ed *M. bovis*, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 3. Anche gli studi su animali richiedono procedure speciali.¹²

Modalità di conservazione - Al ricevimento, conservare le piastre al buio a 2 – 8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. Le piastre preparate, conservate nell'involucro originario a 2 – 8 °C sino al momento dell'uso, possono essere inoculate fino alla data di scadenza e incubate per un massimo di 8 settimane. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto - Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento, fissurazioni o altri segni di deterioramento.

È stato documentato che l'esposizione di questi terreni alla luce solare diretta o indiretta facilita la formazione di formaldeide, che inibisce la crescita di micobatteri.¹⁴

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Per informazioni dettagliate sulle procedure di raccolta e trattamento dei campioni, consultare la documentazione appropriata.^{4,6,15-17}

PROCEDURA

Materiale fornito - Come da ordinazione. Middlebrook 7H10 // 7H10 Agar, Middlebrook 7H11 // 7H11 Selective Agar o Middlebrook 7H10 // 7H11 Selective Agar.

Materiali necessari ma non forniti Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie per questa procedura.

Procedura del test - Adottare tecniche aseptiche. La superficie agar deve essere omogenea e non eccessivamente umida.

I campioni raccolti in asepsi (tessuto escisso chirurgicamente, aspirazioni da lesioni chiuse e fluidi biologici sterili) da pazienti con sospetta micobatteriosi, possono essere inoculati direttamente su terreni di isolamento primario. I campioni contaminati devono essere sottoposti a una procedura di digestione-decontaminazione.⁴

Si raccomanda una soluzione di N-acetil-L-cisteina e idrossido di sodio (NALC-NaOH) come agente - delicato ma efficace - per la decontaminazione e digestione di campioni di espettorato. Per informazioni dettagliate sui metodi di decontaminazione e coltura, consultare la documentazione appropriata.^{4,6,15-17}

Dopo l'inoculo, conservare le piastre al riparo dalla luce e incubarle capovolte (lato agar rivolto verso l'alto) a 35 – 37 °C in atmosfera arricchita di CO₂ per un massimo di 8 settimane. Usare un microscopio da dissezione per esaminare la superficie agar delle colonie dopo 5 – 7 giorni di incubazione e successivamente una volta alla settimana per un massimo di 8 settimane.

Controllo di qualità a cura dell'utente -

1. Verificare che le piastre non presentino segni di deterioramento come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Controllare le performance inoculando un campione rappresentativo di piastre con colture pure di microrganismi di controllo stabili che producono reazioni note e attese. Si consigliano i ceppi di test sottoelencati.

CEPPO PER TEST	TERRENI	RISULTATO ATTESO
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	7H10 7H11 7H11 Selective	Crescita
<i>Mycobacterium kansasii</i> , Gruppo I ATCC 12478	7H10 7H11 7H11 Selective	Crescita
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , Gruppo II ATCC 19981	7H10 7H11 7H11 Selective	Crescita
<i>Mycobacterium intracellulare</i> , Gruppo III ATCC 13950	7H10 7H11	Crescita
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , Gruppo IV ATCC 6841	7H10 7H11 7H11 Selective	Crescita
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7H11 Selective	Inibizione (parziale – completa)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	7H11 Selective	Inibizione (parziale – completa)

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione NCCLS in merito.

RISULTATI

Dopo una sufficiente incubazione, le provette devono evidenziare colonie isolate nelle aree strisciate e crescita confluyente nelle aree di inoculo rilevante.

Le colonie di micobatteri sono omogenee – disomogenee, con estensioni filamentose e all'esame microscopico possono apparire disposte in filamenti spiraliformi o altri pattern. Alcune specie sviluppano una pigmentazione gialla – rossa. *M. tuberculosis* produce tipicamente colonie disomogenee con una tinta color cuoio, disposte in filamenti spiraliformi. La disposizione delle colonie ne determina l'aspetto opaco o

traslucido. Per la conferma dei riscontri, è necessario eseguire colorazione di Gram, test biochimici e altre procedure.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Questi terreni in piastra pronti per l'uso sono destinati all'isolamento primario. Alcuni test diagnostici possono essere eseguiti con la piastra primaria. Per i test biochimici e le procedure sierologiche, si raccomanda tuttavia una coltura pura. Per ulteriori informazioni, consultare la documentazione appropriata.^{4,6,15-17}

Un solo terreno è raramente adatto a rilevare tutti i microrganismi potenzialmente significativi in un campione. Gli agenti in terreni selettivi possono inibire alcuni ceppi delle specie desiderate o consentire la crescita di una specie che erano destinati a inibire, soprattutto se la specie è presente in grandi quantità nel campione. Per ottenere maggiori informazioni e garantire il recupero ottimale di potenziali patogeni, i campioni messi in coltura su terreni selettivi devono pertanto essere messi in coltura anche su terreni non selettivi.

PERFORMANCE

Middlebrook 7H10//7H11 Selective Agar

Prima della spedizione, vengono testati tutti i lotti di Middlebrook 7H10//7H11 Selective Agar per verificarne le caratteristiche specifiche. I campioni vengono testati mediante una piastra inoculata con 0,01 mL di sospensioni in brodo 7H9 di *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 e *M. tuberculosis* ATCC 25177 (inoculi finali contenenti $10^3 - 10^4$ UFC per piastra). Campioni di 7H11 Selective Agar vengono anch'essi testati con 0,001 mL di diluizioni saline di *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231 (inoculi finali contenenti $10^3 - 10^4$ UFC per piastra). Le piastre vengono incubate a 35 ± 2 °C per un massimo di 8 settimane in atmosfera arricchita di CO₂. Con tutti i micobatteri, si osserva una crescita moderata – intensa. Con *E. coli* e *C. albicans* su 7H11 Selective Agar, si osserva inibizione completa - parziale.

DISPONIBILITÀ

N. di cat. Descrizione

295964	BBL Middlebrook 7H10//7H10 Agar, confezione da 20 piastre
297250	BBL Middlebrook 7H11//7H11 Selective Agar, confezione da 20 piastre
298292	BBL Middlebrook 7H10//7H11 Selective Agar, cartone da 100 piastre €€

BIBLIOGRAFIA

1. Middlebrook, G., M.L. Cohn, W.E. Dye, Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. Acta. Tuberc. Scand. 38:66-81.
2. Middlebrook, G., M.L. Cohn, and W.B. Scheffer. 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.
3. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Public Health. 48:844-853.
4. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
5. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 98:295-296.
6. Nolte, F.S., and B. Metchock. 1995. *Mycobacterium*, p. 400-437. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Mitchison, D.A., B.W. Allen, L. Carroll, J.M. Dickinson, and V.R. Aber. 1972. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. J. Med. Mycol. 5:165-175.
8. McClatchy, J.K., R.F. Waggoner, W. Kanes, M.S. Cernich, and T.L. Bolton. 1976. Isolation of mycobacteria from clinical specimens by use of a selective 7H11 medium. Am. J. Clin. Pathol. 65:412-415.
9. Garrod, L.P., and F. O'Grady. 1971. Antibiotic and chemotherapy, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Milliner, R.A., K.D. Strottmeier, and G.P. Kubica. 1969. Formaldehyde: a photothermal activated toxic substance produced in Middlebrook 7H10 medium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 99:603-607.
15. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., R.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
16. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 1998. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
17. Isenberg, H.D. (ed.). 1992. *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



Manufacturer
Producent
Fabrikant
Valmistaja
Fabricant
Hersteller
Κατασκευαστής
Ditta produttrice
Fabrikant
Fabricante
Fabricante
Tillverkare



Use by
Anvendes for
Houdbaar tot
Viimeinkäyttöpäivä
A utiliser avant
Verwendbar bis
Ημερομηνία λήξης
Usare entro
Brukes for
Utilizar em
Usar antes de
Använd före

YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
JJJ-MM-DD / JJJ-MM (MM = einde maand)
VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä)
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
JJJ-MM-TT / JJJ-MM (MM = Monatsende)
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutten av månaden)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutet på månaden)



Catalog number
Katalognummer
Catalogusnummer
Tuotenumero
Numéro catalogue
Bestellnummer
Αριθμός καταλόγου
Numero di catalogo
Katalognummer
Número do catálogo
Número de catálogo
Katalognummer



Authorized Representative in the
European Community
Autoriseret repræsentant i EU
Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie
Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä
Représentant agréé pour la C.E.E.
Autorisierte EG-Vertretung
Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην
Ευρωπαϊκή Κοινότητα
Rappresentante autorizzato nella Comunità
europea
Autorisert representant i EU
Representante autorizado na União Europeia
Representante autorizado en la Comunidad
Europea
Auktoriserad representant i EU



In Vitro Diagnostic Medical Device
In vitro diagnostisk medicinsk anordning
Medisch hulpmiddel voor in vitro
diagnose
Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte
Dispositif médical de diagnostic in vitro
Medizinisches In-vitro-Diagnostikum
In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή
Dispositivo medico diagnostico in vitro.
In vitro diagnostisk medisinsk utstyr
Dispositivo médico para diagnóstico
in vitro
Dispositivo médico de diagnóstico
in vitro
Medicinsk anordning för in
vitro-diagnostik



Temperature limitation
Temperaturbegrænsning
Temperatuurlimiet
Lämpötilarajoitus
Température limite
Zulässiger Temperaturenbereich
Όριο θερμοκρασίας
Temperatura limite
Temperaturbegrænsning
Limitação da temperatura
Limitación de temperatura
Temperaturbegrænsning



Batch Code (Lot)
Batch kode (Lot)
Chargennummer (lot)
Eräkoodi (LOT)
Code de lot (Lot)
Chargencode (Chargenbezeichnung)
Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα)
Codice del lotto (partita)
Batch-kode (Serie)
Código do lote (Lote)
Código de lote (Lote)
Satskod (parti)



Consult Instructions for Use
Læs brugsanvisningen
Raadpleeg gebruiksaanwijzing
Tarkista käyttöohjeista
Consulter la notice d'emploi
Gebruiksaanweisung beachten
Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
Consultare le istruzioni per l'uso
Se i brugsanvisningen
Consulte as instruções de utilização
Consultar las instrucciones de uso
Se bruksanvisningen



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
© 2010 BD.