

FÖRFARANDE FÖR KVALITETSKONTROLL**I INLEDNING**

Middlebrook och Cohn 7H10 agar är ett odlingsmedium för kultivering av mykobakterier.

II PRESTANDATESTFÖRFARANDE**A. Beredning av inokulat**

1. Ympa Lowenstein-Jensen Medium-skivor med stamkulturer av de relevanta mykobakteriestammarna med hjälp av sterila odlingspinnar.
2. Inkubera rör med löst påsatt lock i aerob atmosfär med tillsats av koldioxid vid 35 ± 2 °C tills kraftig tillväxt erhålls (vanligtvis inom 2 – 3 veckor).
3. Skörda växten med en steril formerad applikatorpinne genom att försiktigt avlägsna cellerna från mediets yta. Var noga med att inte odlingsmedium får följa med cellskörden.
 - a. För *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Överför växten till 5,0 mL Middlebrook 7H9-buljong med glycerol i ett sterilt glaströr med skruvlock innehållande sterila glaspärlor.
 - (2) Vortexblanda väl (flera minuter) tills suspensionen är fri från större klumpar.
 - (3) Jämför denna suspension med en McFarland-standard nr. 1 med hjälp av en nefelometer. Suspensionen ska vara grumligare än standarden.
 - (4) Placera röret i ett ställ vid rumstemperatur i 2 – 3 timmar så att stora partiklar kan sjunka till botten.
 - (5) Överför supernatanten till en steril behållare.
 - (6) Justera suspensionens grumlighet till McFarland-standard nr. 1 genom att långsamt tillsätta steril Middlebrook 7H9-buljong med glycerol. Skaka väl.
 - (7) Späd till 10^5 CFU/mL före användning. Blanda väl och inokulera testmediet genom utstryk med hjälp av en 0,01 mL kalibrerad ögla.
 - b. För alla övriga mykobakteriestammar:
 - (1) Överför växten till ett sterilt 50 mL centrifugrör med skruvkork innehållande 8 – 12 sterila glaspärlor (2 mm diameter) och 5 mL diluent för mykobakterier som beretts enligt nedan:
 - Blanda följande ingredienser i en 1-litersflaska och justera pH-värdet med hjälp av 1N natriumhydroxid till 6,7 till 7,0:
Bovint albumin (fettsyrafritt)1,0 g
Polysorbat 800,1 mL
Aqua purif.500 mL
 - Sterilisera genom membranfiltrering (0,2 µ filter).
 - Dispensera aseptiskt mängder om 5,5 mL i sterila rör med skruvkork.
 - (2) Emulgera, med hjälp av en applikatorpinne, mykobakterieväxten på sidoväggen av ett centrifugrör med skruvkork. Blanda växten med diluenten.
 - (3) Skruva på korken på röret och vortexblanda i ungefär 10 min tills växten är väl suspenderad och fri från stora klumpar.
 - (4) Tillsätt 15 mL steril diluent för mykobakterier och blanda noga.
 - (5) Jämför denna suspension med en McFarland-standard nr. 1 med hjälp av en nefelometer. Suspensionen ska vara grumligare än standarden.
 - (6) Placera röret i ett ställ vid rumstemperatur i 2 – 3 timmar så att stora partiklar kan sjunka till botten.
 - (7) Aspirera supernatanten och för över den till en steril behållare. Suspensionen ska vara grumligare än en McFarland-standard nr. 1 och fri från stora partiklar. Om det fortfarande finns stora partiklar, blanda och låt stå i ytterligare 1 timme. Överför supernatanten till en steril behållare.
 - (8) Justera suspensionens grumlighet till McFarland-standard nr. 1 genom att långsamt tillsätta steril diluent för mykobakterier. Skaka väl.
 - (9) Dispensera alikvoter av suspensionen i frysflaskor märkta med identifiering av organismen och beredningsdatum.
 - (10) Frys suspensionen genom att placera flaskorna i lågtemperaturfrys vid -60 °C. Flaskorna kan förvaras i upp till 6 månader.
 - (11) Vid användning tas den frusna flaskan ut ur frysen och innehållet snabbtinas genom att flaskan placeras i 30 – 35 °C varmt vattenbad. Späd till 10^5 CFU/mL före användning. Blanda väl och inokulera testmediet genom utstryk med hjälp av en 0,01 mL kalibrerad ögla.

B. Förfarande för testning av medium

1. Inokulera representativa prover med de odlingar som anges nedan.
 - a. Säkerställ att agarytorna är fria från fukt inför inokulering.
 - b. Använd sterila 0,01 mL ympöglor för engångsbruk och ympa testbehållarna med mykobakterieodlingar som beretts enligt ovanstående beskrivning.
 - c. Inkubera alla behållare med löst påsatt kork vid 35 ± 2 °C i aerob atmosfär med tillsats av koldioxid.
 - d. Inkludera rör med tidigare testad Middlebrook 7H10 agar som kontroller.
2. Undersök behållarna efter 7, 14 och vid behov 21 dagar med avseende på tillväxt, selektivitet och pigmentering.
3. Förväntade resultat

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

*Rekommenderad organismstam för kvalitetskontroll utförd av användaren.

OBS! Måste övervakas av användarna i enlighet med CLSI M22-A3.

III YTTERLIGARE KVALITETSKONTROLL

1. Undersök rören eller flaskorna enligt beskrivningen i avsnittet "Produktförsäkring".
2. Undersök representativa rör eller flaskor visuellt för att säkerställa att inga existerande fysiska defekter kommer att inverka på användningen.
3. Inkubera ej inokulerade representativa rör eller flaskor vid 20 – 25 °C och 30 – 35 °C och undersök dem efter 7 dagar med avseende på mikrobiell kontamination.

PRODUKTINFORMATION

IV AVSEDD ANVÄNDNING

Middlebrook och Cohn 7H10 agar används i kvalitativa förfaranden för isoleringen och kultiveringen av mykobakterier.

V SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Under årens lopp har många odlingsmedia uttänkts för kultiveringen av mykobakterier. De tidigaste var äggbaserade formuleringar och inkluderade Lowenstein-Jensens medium och Petraganis medium. Dubos och Middlebrook var instrumentella i utvecklingen av ett antal formuleringar, vilka innehöll oljesyra och albumin som nyckelbeståndsdelar för att stimulera tillväxten av tuberkelbakterien och för att skydda organismerna mot olika slags toxiska agens.¹ Senare förbättrade Middlebrook och Cohn formuleringen av oljesyra-albumin-agar och erhöll en snabbare, kraftigare växt av *Mycobacterium* species på deras eget medium, som betecknades 7H10.^{2,3} Det har rapporterats att 7H10 tillåter färre kontaminanter att växa än den äggbaserade media, som vanligtvis används för kultiveringen av mykobakterier.⁴

VI PRINCIPER FÖR FÖRFARANDET

Middlebrook och Cohn 7H10-agar innehåller en mångfald av oorganiska salter som ger substanser som är essentiella för tillväxten av mykobakterier. Natriumcitrat, när konverterat till citronsyra, är ägnad till att bevara oorganiska kationer i lösning. Glycerol är en rik källa för kol och energi. Oljesyra, liksom även långkedjade fettsyror, kan utnyttjas av tuberkelbakterien och spelar en viktig roll i metabolismen av mykobakterier. Albuminets primära effekt är att skydda tuberkelbakterien från toxiska agenser och följaktligen förstärker det bakteriernas återvinning vid primär isolering. Katalas bryter ned toxiska peroxider som kan finnas i mediet. Partiell hämning av bakterier erhålls genom närvaron av malakitgrönt färgmedel.

VII REAGENSER

Middlebrook och Cohn 7H10 agar

Ungefärlig sammansättning* per liter renat vatten

Magnesiumsulfat	0,05 g	Bovint albumin (fraktion V)	5,0 g
Järnammoniumcitrat	0,04 g	Katalas	3,0 mg
Natriumcitrat	0,4 g	Pyridoxin	1,0 mg
Ammoniumsulfat	0,5 g	Zinksulfat	1,0 mg
Mononatriumglutamat	0,5 g	Kopparsulfat	1,0 mg
Dinatriumfosfat	1,5 g	Biotin	0,5 mg
Monokaliumfosfat	1,5 g	Kalciumklorid	0,5 mg
Agar	13,5 g	Malakitgrönt	0,25 mg
Natriumklorid	0,85 g	Oljesyra	0,06 mL
Dextros	2,0 g	Glycerol	5,0 mL

*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

Varningar och försiktighetsbeaktanden: Avsett för *in vitro*-diagnostik.

Rör och flaskor med lock som sitter åt hårt ska öppnas försiktigt så att inte skador inträffar på grund av att glaset går sönder. Patogena mikroorganismer, inklusive hepatitvirus och humant immunbristvirus, kan förekomma i kliniska prover. "Allmänna försiktighetsbeaktanden"⁵⁻⁸ och institutionens riktlinjer ska följas vid hantering av alla föremål som är kontaminerade med blod eller andra kroppsvätskor. Beredda rör, provbehållare och övrigt kontaminerat material skall steriliseras i autoklav innan de kasseras.

Rutiner och procedurer samt spridningsskyddande utrustning och anläggningar enligt biosäkerhetsnivå 2 krävs vid icke-aerosolproducerande hantering av kliniska prover som t.ex. vid preparering av syrafasta utstryk. Samtliga aerosolgenererande aktiviteter måste utföras i ett biologiskt säkerhetsskåp av klass I eller II. För laboratorieaktiviteter som innefattar förökning och hantering av odlingar av *M. tuberculosis* och *M. bovis* krävs rutiner samt spridningsskyddande utrustning och anläggningar enligt biosäkerhetsnivå 3. Djurstudier kräver dessutom särskilda förfaranden.⁷

Förvaringsanvisningar: Förvara rör och flaskor mörkt vid 2 – 8 °C efter leverans. Överhettning och nedfrysning skall undvikas. Får ej öppnas förrän omedelbart före användning. Undvik exponering för ljus. Medier som förvarats enligt anvisningarna till precis före användning kan inokuleras fram till utgångsdatum och inkuberas under de rekommenderade inkubationstiderna. Låt mediet värmas till rumstemperatur före inokulering.

Produktnedbrytning: Rör eller flaskor får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning eller annan försämring.

VIII PROVTAGNING OCH -FÖRBEREDELSE

Prover som är lämpliga för odling kan hanteras med olika metoder. För detaljerad information hänvisas till lämplig litteratur.⁹⁻¹¹ Prover skall tas före administrering av antimikrobiella medel. Åtgärder måste vidtas för snabb leverans till laboratorium.

IX FÖRFARANDE

Tillhandahållt material: Middlebrook och Cohn 7H10 agar

Material som krävs men ej medföljer: Extra odlingsmedier, reagenser, organismer för kvalitetskontroll och laboratorieutrustning efter behov.

Testförfarande: Använd aseptisk teknik.

Testförfarandena är de som rekommenderas av Centers for Disease Control and Prevention (CDC) för primärisolering från prover som innehåller mykobakterier.⁹ En lösning av N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid (NALC-NaOH) rekommenderas som ett skonsamt men effektivt medel för enzymbehandling och dekontaminering. Dessa reagenser tillhandahålls i **BBL MycoPrep** mykobakteriell provbehandlings-/dekontamineringsats. För detaljerade instruktioner avseende dekontaminering och odling, se en lämplig referens.⁹⁻¹²

Efter inokulering ska behållarna skyddas mot ljus och placeras i ett lämpligt system med aerob atmosfär som är berikad med koldioxid. Inkubera vid 35 ± 2 °C.

Medier i skivor och flaskor ska inokuleras horisontellt tills inokulatet absorberats. Rör och flaskor ska alltid ha löst påskruvat lock de första 3 veckorna så att koldioxid kan cirkulera och tillväxten starta. Dra sedan åt locket för att förhindra dehydrering. Lossa kortvarigt en gång i veckan. Ställ rören upprätt om detta krävs av utrymmesskal.

OBS! Odlingar från hudlesioner som misstänks vara orsakade av *M. marinum* eller *M. ulcerans* måste inkuberas vid 25 – 33 °C för primärisolering, medan kulturer som misstänks innehålla *M. avium* eller *M. xenopi* uppvisar optimal växt vid 40 – 42 °C.⁹ Inkubera en extra odling vid 35 – 37 °C.

Kvalitetskontroll utförd av användaren: Se "Förfaranden för kvalitetskontroll".

Kvalitetskontroll måste utföras i enlighet med gällande bestämmelser eller ackrediteringskrav samt laboratoriets etablerade procedurer för kvalitetskontroll. Det rekommenderas att användaren konsulterar tillämpliga CLSI-riktlinjer och CLIA-föreskrifter för lämpliga kvalitetskontrollförfaranden.

X RESULTAT

Odlingar ska läsas av inom 5 – 7 dagar efter ympning och en gång i veckan därefter i upp till 8 veckor.

Anteckna observationer.⁹

1. Antal dagar innan kolonierna blev makroskopiskt synliga. Snabbväxare har mogna kolonier inom 7 dagar. Långsamma växare behöver mer än 7 dagar för att bilda mogna kolonier.
2. Antal kolonier (flaskor):
Inga kolonier = negativt
Mindre än 50 kolonier = faktiskt antal
50 – 100 kolonier = 1+
100 – 200 kolonier = 2+
Nästan sammanhängande (200 – 500) = 3+
Sammanhängande (mer än 500) = 4+
3. Färgutveckling:
Vita, gräddfärgade eller matt gula = icke-kromogena (NC)
Citrongula, gula, orange, röda = kromogena (Ch)

Färgade utstryk kan visa syrafasta bakterier, vilka rapporteras endast som "syrafasta bakterier", såvida inte definitiva tester utförs.

Flaskor kan undersökas genom att flaskorna vänds upp och ned på stativet till ett dissektionsmikroskop. Läs av vid 10 – 60x med transmittat ljus. Gå över snabbt vid 10 – 20x förstoring för närvaron av kolonier. Högre förstoring (30 – 60x) är till hjälp vid iakttagande av kolonimorfologi, dvs. serpentinsträngslika kolonier.

XI FÖRFARANDETS BEGRÄNSNINGAR

För identifiering måste organismer vara i renodling. Morfologiska, biokemiska och/eller serologiska tester bör utföras för fullständig identifiering. Se lämplig litteratur för noggrann information och rekommenderade förfaranden.⁹⁻¹²

XII KLINISKA PRESTANDA

Alla partier med behållare innehållande Middlebrook och Cohn 7H10 agar har prestandatestas innan de släpps på marknaden. Med hjälp av en 0,01 mL kalibrerad ögla inokuleras representativa prover ur partiet med utstryk av odlingar som utsätts så att de innehåller 10^5 kolonibildande enheter (CFU) per mL *Mycobacterium kansasii* grupp I (ATCC 21478), *M. scrofulaceum* grupp II (ATCC 19981), *M. intracellulare* grupp III (ATCC 13950), *M. fortuitum* grupp IV (ATCC 6841) och *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Efter inokulering inkuberas behållarna med löst påsatt kork vid 35 ± 2 °C i aerob atmosfär med tillsats av 5 – 10 % koldioxid. Behållarna läses av med avseende på växt och pigmentering efter 7, 14 och 21 dagars inkubering. Alla organismer uppvisar måttlig till kraftig växt inom 21 dagar. Kolonial pigmentering är som följer: *M. kansasii* är vit till gräddgul; *M. scrofulaceum* är mellangul till orange; *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* och *M. fortuitum* är gräddfärgade.

XIII TILLGÄNGLIGHET

Kat. nr.	Beskrivning
220958	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (agarskivor), förpackning med 10 st. rör storlek A
220959	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (agarskivor), kartong med 100 st. rör storlek A
297448	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants (agarskivor), förpackning med 10 st. rör storlek C
297396	BD BBL Middlebrook och Cohn 7H10 Agar Slants (agarskivor), kartong med 100 st. rör storlek C
297274	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, flaskor 1 oz. (30 mL), kartong med 100 st.

XIV REFERENSER

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: Kontakta närmaste BD-representant eller besök 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