



BD Middlebrook 7H10 Agar

AVSEDD ANVÄNDNING

BD Middlebrook 7H10 Agar (BD Middlebrook 7H10-agar) används för isoleringen och kultiveringen av mykobakterier.

PRINCIPER FÖR OCH FÖRKLARING AV METODEN

Mikrobiologisk metod.

Under detta sekel har många odlingsmedia uttänkts för kultiveringen av mykobakterier. De tidigaste var äggbaserade formuleringar och inkluderade Löwenstein-Jensens medium och Petragnanis 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

I **BD Middlebrook 7H10-agar** tillhandahåller en mångfald av inorganiska salter substanser som är essentiella för tillväxten av mykobakterier. Natriumcitrat, när konverterat till citronsyra, är ägnad till att bevara inorganiska 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. Katalas bryter ned toxiska peroxider som kan finnas i mediet. Albuminet primära effekt är att skydda tuberkelbakterien från toxiska agens och följaktligen förstärket det bakteriernas återvinning vid primär isolering. Partiell hämning av kontaminerande bakterier erhålls genom närvaron av malakitgrönt färgmedel.

REAGENSER

BD Middlebrook 7H10-agar

Sammansättning* per liter aqua purif

Magnesiumsulfat	0,025 g	Bovint albumin V	5,0 g
Järnammoniumcitrat	0,04	Katalas	0,004
Natriumcitrat	0,4	Pyridoxin	0,001
Ammoniumsulfat	0,5	Zincksulfat	0,001
Mononatriumglutamat	0,5	Kopparsulfat	0,001
Dinatriumfosfat	1,5	Biotin	0,0005
Monokaliumfosfat	1,5	Kalciumklorid	0,0005
Agar	17,0	Malakitgrönt	0,00025
Natriumklorid	0,85	Glycerol	5,0
Glukos	2,0	Oleinsyra	0,05 mL

pH 6,6 +/- 0,2

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

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

IVD . Endast för professionellt bruk. ⓧ

Plattorna får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning, sprickbildning eller annan försämring.

Se skriften **ALLMÄN BRUKSANVISNING** för information om aseptiska förfaranden vid hantering, biorisker och bortskaffning av använd produkt.

Laboratorieprocedurer som involverar mykobakterier kräver speciell utrustning och teknik för att minimera bioriskerna.⁵⁻⁷ Biosäkerhetsnivå 3 krävs för hantering av prover och odlingar.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvara plattorna mörkt vid 2 till 8 °C i originalomslaget efter mottagandet fram till dess de skall användas. Överhettning och nedfrysning skall undvikas. Plattorna kan inokuleras fram till utgångsdatum (se etiketten på förpackningen) och inkuberas under rekommenderad inkubationsperiod.

Plattor från öppnade 10-plattförpackningar kan användas i en vecka vid förvaring i ren miljö vid 2 till 8°C.

KVALITETSKONTROLL UTFÖRD AV ANVÄNDAREN

Inokulera representativa prover med följande stammar (för ytterligare information hänvisas till skriften **ALLMÄN BRUKSANVISNING**). Inkubera de inokulerade plattorna aerobt vid 35 +/- 2 °C eller i en aerob miljö kompletterad med koldioxid.

Stam	Inkubation	Resultat
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	2 till 3 veckor	God till utmärkt växt
<i>Mycobacterium fortuitum</i> DSM 46621	2 till 3 veckor	God till utmärkt växt
<i>Mycobacterium smegmatis</i> DSM 43061	2 till 5 dagar	God till utmärkt växt
<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	2 till 3 veckor	Ansenlig till utmärkt växt
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2 till 5 dagar	Inhiberad
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2 till 5 dagar	Inhiberad
Ej inokulerad	Bärnstensfärgad, mycket svagt grönaktig färgton	

FÖRFARANDE

Tillhandahållt material

BD Middlebrook 7H10-agar (90 mm **Stacker**-plattor). Mikrobiologiskt kontrollerade.

Material som ej medföljer

Extra odlingsmedier, reagenser och laboratorieutrustning efter behov.

Provtyper

Detta medium används för isoleringen och kultiveringen av mykobakterier från kliniska prover och kan också användas för kultiveringen av mykobakterier i speciella tester (t.ex. för testning av desinfektionsmedel mot mykobakterier).

För detaljer avseende lämpliga prover, se referenserna.⁶⁻¹⁰

Testförfarande

Testprocedurerna är de som rekommenderas av Centers for Disease Control and Prevention (CDC, motsvarande Smittskyddsinstitutet, SMI, i Sverige) för primär isolering från prover innehållande mykobakterier. En lösning av N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid (NALC-NaOH) rekommenderas som ett skonsamt men effektivt medel för enzymbehandling och dekontaminering. För detaljerade instruktioner avseende dekonatamination och odlingsmetoder, se referenserna.⁴⁻¹⁰

Efter inokulation, förvara plattorna skyddade från ljus och placera dem med mediet nedåt i en **BD GasPak**-burk, vilken sköts med ett **GasPak** koldioxidgenererande kuvert för engångsbruk, eller ett annat lämpligt system, vilket ger en aerob miljö anrikad med koldioxid. Inkubera vid 35 ±2 °C. Undvik uttrokning av mediet under inkubation.

Obs! Kulturer från hud och skador i mjukvävnader som misstänks innehålla *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. Chelonae* eller andra species med ett lågt temperaturoptimum, måste inkuberas vid 25 till 33 °C. Inkubera ytterligare en kultur vid 35 till 37 °C.^{5,9}

Resultat

Plattorna kan avläsas inom 5 till 7 dagar efter inokulation och därefter, en gång i veckan i upp till 8 veckor. För detaljer avseende kolonimorfologi och pigmentering, se referenserna.⁶⁻¹⁰

För avläsning av plattorna, invertera dessa på objektbordet av ett dissektionsmikroskop. Avläs vid 10-60x förstoring med transmittande 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.

Anteckna följande observationer: ^{5,6}

1. Antal dagar innan kolonierna blev makroskopiskt synliga.

2. Antal kolonier:

Inga kolonier = negativt

Mindre än 50 kolonier = anteckna aktuellt antal

50-100 kolonier = 1+

100-200 kolonier = 2+

Nästan sammanhängande (200-500) = 3+

Sammanhängande (mer än 500) = 4+

3. Färgutveckling

Vita, krämfärgade eller matt gula = icke-kromogena (NC)

Citrongula, gula, orange, röda = kromogena (Ch)

Färgade stryk kommer att visa syrafasta bakterier, vilka endast rapporteras som "syrafasta bakterier" om ej definitiva tester utförts. Se lämpliga referenser för information avseende vidare differentierande tester och procedurer för fullständig identifikation av de isolerade organismerna. ⁴⁻¹⁰

KLINISKA PRESTANDA OCH METODENS BEGRÄNSNINGAR

BD Middlebrook 7H10-agar är en av standardagarmedia för isoleringen och kultiveringen av mykobakterier från kliniska prover. ^{4,6,7-11}

Eftersom detta medium endast är partiellt selektivt, kan andra bakterier än mykobakterier växa om proverna inte har förbehandlats på ett lämpligt sätt avseende dekontamination. ^{6,7,9,10}

Negativa odlingar utesluter inte en aktiv mykobakterieinfektion. För bra rutiner, bör flera olika mediaformuleringar (fasta och flytande) inokuleras. ⁶⁻¹⁰

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, 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. 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. 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. Tenen (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

FÖRPACKNINGAR/TILLGÄNGLIGHET

BD Middlebrook 7H10 Agar

Kat.nr 254520	Färdiga odlingsplattor, 20 st. per förpackning
Kat.nr 254521	Färdiga odlingsplattor, 120 per förpackning

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