

**MIDDLEBROOK 7 H 11 AGAR**

Piastre pronte

**DESTINAZIONE D'USO**

Terreno pronto all'uso in piastra per la coltivazione dei micobatteri e per il test di sensibilità

**FORMULA TIPICA\***

Triptone	1.0 g
Ammonio solfato	0.5 g
Acido L-glutammico	0.5 g
Sodio citrato	0.4 g
Sodio fosfato bibasico	1.5 g
Potassio fosfato monobasico	1.5 g
Agar	13.5 g
Magnesio solfato	50.0 mg
Fe-Ammonio citrato	40.0 mg
Piridossina HCl	1.0 mg
Biotina	0.5 mg
Verde malachite	1.0 mg
Acido oleico	50.00 ml
Albumina bovina Fraz. V	5.00 g
Glucosio	2.00 g
Catalasi	4.00 mg
Sodio cloruro	850.00 mg
Acqua distillata	1000.0 ml

pH 6.6 ± 0.2

\*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

**DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

nel 1947 Dubos e Middlebrook svilupparono un terreno liquido, il 7H 9, con albumina ed acido oleico per la crescita dei bacilli tubercolari. Questa formulazione fu modificata nel 1958 da Middlebrook e Cohn ottenendosi così il 7H10 che consentiva, rispetto al 7H 9 una crescita più rapida e più intensa dei micobatteri. Nel 1968 Cohn aggiunse l'idrolizzato di caseina al 7H10 per la stimolazione della crescita dei ceppi che non crescevano su 7H10, ottenendosi così il 7H11. Il terreno è costituito da composti inorganici, vitamine e cofattori che costituiscono elementi necessari alla crescita, glicerolo che è una fonte di azoto ed acido oleico ed albumina che svolgono un'azione protettiva verso una varietà di agenti tossici, catalasi per eliminare i perossidi che si sviluppano durante la crescita e sono tossici, glucosio come fonte di energia, sodio cloruro per un corretto equilibrio osmotico.

Middlebrook 7H11 Agar addizionato degli arricchimenti descritti è utilizzato per la coltivazione primaria e secondaria dei micobatteri e per il test di sensibilità. L'impiego di terreni limpidi agarizzati al posto di quelli contenenti uova consente una valutazione più accurata delle caratteristiche morfologiche delle colonie ed una loro eventuale osservazione microscopica.

**METODO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Le piastre devono essere inoculate in doppio, strisciando il materiale da esaminare, opportunamente trattato (decontaminazione e neutralizzazione), sulla superficie del terreno. Incubare a 37 °C in atmosfera con CO<sub>2</sub>. Esaminare dopo 5-7 giorni e poi ogni settimana per 8 settimane. L'esame dovrebbe essere eseguito visivamente e con una lente d'ingrandimento. Riportare la morfologia delle colonie e la pigmentazione. Fare riferimento ai testi specialistici per l'interpretazione della crescita ottenuta sul terreno IUT Medium e per l'identificazione delle colonie.

Per la determinazione delle MIC con Etest di *M.tuberculosis* utilizzare il terreno secondo le seguenti modalità:

Terreno	Middlebrook 7H 11 Agar (cat. n° 549870)
Inoculo	Sospendere in Middlebrook 7H9 Broth, (cat. N° 551706) + 0,5% Tween o 2% glicerolo, vortexare per 3-5 min. con palline di vetro, lasciare sedimentare per 20 minuti ed aggiustare il supernatante ad un'opacità pari a McFarland 3-4. In alternativa impiegare la brodocoltura di un sistema automatico (GI-999).



Preincubazione	37°C, 5-10% CO <sub>2</sub> , 24 ore
Applicazione	Posizionare 1 striscia per piastra con la parte terminale (con la sigla) vicina al bordo piastra.
Incubazione	37°C/5-10% CO <sub>2</sub> /5-10 giorni in funzione del ceppo
Manipolazione	Lavorare con le precauzioni dell'asepsi per rendere minime le contaminazioni. Sigillare le piastre per evitare che si secchino. Usare le precauzioni di sicurezza e una cappa a protezione dell'operatore (classe IIa)

**LIMITI DEL METODO**

Incubare in un termostato a CO<sub>2</sub>, non utilizzare il metodo della candela. Porre attenzione a proteggere il terreno dalla luce e dal calore. L'esposizione alla luce ed al calore provoca la formazione di formaldeide che risulta tossica per la crescita dei micobatteri.

Per la determinazione delle MIC di *M.tuberculosis* con Etest consultare il foglio istruzioni del prodotto.

**CONSERVAZIONE E VALIDITÀ**

Conservare a 2-8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento. Validità dalla data di produzione: 4 mesi.

**PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI**

Il terreno in piastra qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni  $\geq 1\%$ . Il terreno in piastra qui descritto deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

**BIBLIOGRAFIA**

- Dubos R.J., Middlebrook G. (1947) Am.Rev. Tuberc. 56, 334
- Kubica, G.P. and W.E. Dye (1967) - Laboratory Methods for Clinical and Public Health Mycobacteriology, USHS, CDC, ub. 1547.
- Lenette, E.H.; Spaulding, E.H.& Truant, J. (1974) - Manual of Clinical Microbiology, 2nd Ed., Washington; American Society for Microbiology.
- Middlebrook G., Cohn M.L., (1958) Am.J.Public Health, 48, 844
- Middlebrook G., Cohn M.L., Dye, Russel and Levy (1960) Acta Tuberc. Scand. 38, 66.
- Sommers, H.M. and J.K. McClatchy (1983) - Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Cumitech 16, ASM, Washington, D.C.
- Wanger et al. Etest for susceptibility testing of *M. tuberculosis* and *M. avium-intracellulare*. DMID, vol. 19, no. 3, p. 179-181, 1994.
- Wanger A. and Mills K. Etest for susceptibility testing of *M. tuberculosis* to first line anti-tuberculous agents. ASM, poster U-67, 1995.
- Wanger et al. Testing of *M. tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazide, rifampicin and streptomycin by using Etest. JCM, vol. 34, no. 7, p. 1672-1676, 1996.

**CONFEZIONE****549870****Middlebrook 7H11 Agar,****20 piastre da 90 mm, confezionate in film plastico, in scatola di cartone.**

CODICE CND: W0104010403



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.