



## Middlebrook 7H10 Agar

Moderately selective medium for the isolation and cultivation of mycobacteria.

### INTENDED PURPOSE

Solid medium used for the selective isolation of *Mycobacterium* spp., especially *Mycobacterium tuberculosis*, from clinical specimens as well as for the cultivation of pure cultures of mycobacteria. This medium is intended as an aid in the diagnosis, requiring additional tests to complete the diagnostic results.

### DESCRIPTION

There are many culture media that have been devised for the cultivation of mycobacteria over the years. The early ones were egg-based formulations which included Lowenstein-Jensen Medium and Petragnani Medium. Later, Dubos and Middlebrook developed various formulations containing oleic acid and albumin, which protected *Mycobacterium* from toxic agents, helping for the growth of tubercle bacilli. Subsequently, Middlebrook and Cohn improved the formulation to develop 7H10 medium, which allowed faster and more luxuriant growth of *Mycobacterium* species.

Middlebrook 7H10 Agar (with OADC supplement and glycerol) is used for isolation, cultivation, and sensitivity testing of *M. tuberculosis*. It has been reported that the 7H10 medium tends to grow fewer contaminants than the egg-based media commonly used for the cultivation of mycobacteria.

### TYPICAL FORMULA\* (Per Litre of Purified Water)

Basal medium	
L-Glutamic Acid	0.5 g
Sodium Citrate	0.4 g
Pyridoxine Hydrochloride	0.001 g
Biotin	0.0005 g
Ferric Ammonium Citrate	0.04 g
Ammonium Sulfate	0.5 g
Disodium Phosphate	1.5 g
Monopotassium Phosphate	1.5 g
Magnesium Sulfate	0.025 g
Malachite Green	0.00025 g
Agar	15.0 g
Calcium Chloride	0.0005 ml
Zinc Sulfate	0.001 g
Copper Sulfate	0.001 g
Final pH 6.6 ± 0.2 at 25°C	

OADC supplement	
Oleic Acid	0.06 ml
Catalase	0.003 g
Bovine Albumin (Fraction V)	5.0 g
Glucose	2.0 g
Sodium Chloride	0.85 g

OADC: Oleic acid, Albumin, Dextrose, Catalase.

Glycerol supplement	
Glycerol	5.0 ml

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

### Complete medium

Base + Supplements



Supplementation of the agar base is required to obtain mycobacterial growth.

### METHOD PRINCIPLE

Glutamic acid, sodium citrate, pyridoxine, biotin and ammonium sulfate supply growth factors. Ferric ammonium citrate, magnesium sulfate, calcium chloride, zinc sulfate and copper sulfate are sources of trace ions. Phosphates help maintaining the pH of the medium. Malachite green is the selective agent inhibiting the contaminant microbial flora. Malachite green serves as pH indicator as well. Agar is the solidifying agent. Glycerol and glucose are energy sources. Sodium chloride maintains the osmotic equilibrium. Albumin protects the tubercle bacilli against toxic agents. Catalase destroys toxic peroxides that may be present in the medium. Oleic acid is a fatty acid utilized in the mechanism of mycobacteria.

## PREPARATION

### Dehydrated medium.

Suspend 19.5 g of powder in 900 ml of distilled or deionized water containing 5 ml of Glycerol supplement. Heat to boil until completely dissolved. Autoclave at 121 °C for 15 minutes. Cool to 45-50 °C and aseptically add 100 ml Middlebrook 7H10 supplement. Mix well and pour into sterile final containers (this medium is prepared in slant tubes or plates).

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: Autoclave, sterile Petri plates, test tubes, inoculating loops, swabs, incubator, quality control organisms.

## SPECIMENS

Specimens submitted for mycobacterial culture fall into two categories: specimens normally contaminated with resident flora, and specimens from normally sterile sites. Contaminated specimens require a decontamination step before culture to reduce the likelihood of overgrowth by organisms other than mycobacteria. Specimens should be obtained before antimicrobial therapy (where possible) and promptly delivered to the laboratory for examination.

Refer to specific guidelines for more detailed information.

## TEST PROCEDURE

Inoculate processed specimen onto the medium. Process clinical specimens as soon as possible. Concentration of samples (for example centrifugation) may be required. Depending on the specimen type and method used, it may be necessary to go through one or more of the following stages before culture: homogenization, digestion/decontamination, and neutralization.

Keep plates and tubes shielded from light and incubate at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for up to 8 weeks in aerobic atmosphere enriched with 5-10% carbon dioxide.

For more detailed information, consult appropriate guidance.

## INTERPRETING RESULTS

Examine weekly for growth, pigment production and colony morphology. Carry out identification tests according to established laboratory procedures.

## STORAGE

The powder is very hygroscopic: store the powder at 10-30 °C, in a dry environment, in its original container tightly closed and use it before the expiry date on the label or until signs of deterioration or contamination are evident. Store slant tubes and prepared plates at 2-8 °C.

## SHELF LIFE

Ready-to-use plates: 6 months.

Medium in tubes: 1 year.

Dehydrated medium: 4 years.

Supplements: 2 years.

## QUALITY CONTROL

**Appearance of OADC Supplement:** Amber liquid, limpid or slightly opalescent.

**Appearance of Glycerol Supplement:** Dense colourless substance of oily appearance.

**Appearance of Dehydrated Medium:** Free-flowing, homogeneous. Light beige with green tint.

**Appearance of Prepared Medium:** Slightly opalescent, light yellowish green.

### Expected Cultural Response:

Control strain		Inoculum	Incubation	Specification
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC® 13950	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> CFU	up to 21 d/ 35 ± 2°C/ 5-10% CO <sub>2</sub>	Good growth
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	ATCC® 19981			
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup> CFU		Partial to complete inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC® 19615			

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis (CoA).

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance testing of Middlebrook 7H10 Agar was carried out using the QC strains listed above. The results obtained met the established criteria.

## LIMITATIONS

Negative culture results do not rule out active infection of mycobacteria.

Some factors of unsuccessful cultures are:

- The specimen was not representative of the infectious material, e.g. saliva instead of sputum.
- The mycobacteria were destroyed during digestion and decontamination of the specimen.
- Gross contamination interfered with the growth of mycobacteria.
- Proper aerobic conditions and increased CO<sub>2</sub> tension were not provided during incubation.

Since this medium is only partially selective, bacteria other than mycobacteria may grow if specimens are not appropriately pretreated for decontamination.

## WARNING AND PRECAUTIONS

- 1) **For *in vitro* diagnostic use (IVD).**
- 2) **For laboratory professional use only.**
- 3) Operators must be trained and have certain experience. Please read the instructions carefully before using the product. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this document.
- 4) Consult the Safety Data Sheet (SDS) for information regarding hazards and safe handling practices.
- 5) Do not use if the product or packaging appears to be damaged.
- 6) Follow standard precautions. All patient specimens should be considered potentially infectious and handled accordingly.
- 7) Handle all specimens as if infectious using safe laboratory procedures. Dispose of hazardous or biologically contaminated materials according to the practices of your institution.
- 8) Avoid cross-contamination of samples by using disposable tips and changing them after each sample.
- 9) Do not mix reagents of different batches. Please use the product within the validity period.
- 10) Do not eat, drink, smoke, apply cosmetics or handle contact lenses in areas where reagents and human specimens are handled.
- 11) Results should be interpreted by a trained professional in conjunction with the patient's history and clinical signs and symptoms, and epidemiological risk factors.
- 12) Ensure laboratory equipment is calibrated and maintained in accordance with the laboratory's procedure.
- 13) When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.

## DISPOSAL OF WASTE

Disposal of waste must be carried out according to national and local regulations in force.

## BIBLIOGRAPHY

See the references at the end of this document.

## TABLE OF SYMBOLS

See the table of symbols at the end of this document.

**The product is available in the various configurations listed below.** There may be additional product ref. numbers as well. For an updated listing of available products, visit [liofilchem.com](http://liofilchem.com)

Product	Format	Packaging	Ref.
Middlebrook 7H10 Agar*	Plate 90 mm	20 plates	10453
	Slant tube	10 x 8.5 ml	30368
Middlebrook 7H10 Agar Base	Dehydrated media	500 g	611022
Middlebrook 7H10 (OADC) supplement	Bottle	4 x 50 ml	81035
Glycerol supplement	Bottle	4 x 50 ml	80021 •

\* Complete medium

• Not CE-IVD marked

## Revision History

Revision	Release Date	Change Summary
0	2023-04-17	Updated layout and content in compliance with IVDR 2017/746, version reset to revision 0

This IFU document and the SDS are available from the online Support Center:

[liofilchem.com/ifu-sds](http://liofilchem.com/ifu-sds)



## Middlebrook 7H10 Agar

Terreno moderatamente selettivo per l'isolamento e la coltivazione dei micobatteri.

Istruzioni per l'uso

ITALIANO

### DESTINAZIONE D'USO

Terreno solido utilizzato per l'isolamento selettivo di *Mycobacterium* spp., in particolare *Mycobacterium tuberculosis*, da campioni clinici e per la coltivazione di colture pure di micobatteri. Il terreno è inteso come ausilio alla diagnosi, e richiede ulteriori test per completare i risultati diagnostici.

### DESCRIZIONE

Nel corso degli anni sono stati scoperti diversi terreni di coltura per la coltivazione di micobatteri. I primi erano formulazioni a base di uova che includevano Lowenstein-Jensen Medium e Petraghani Medium. Successivamente, Dubos e Middlebrook svilupparono varie formulazioni contenenti acido oleico e albumina, che proteggevano il *Mycobacterium* da agenti tossici, favorendo la crescita dei bacilli tubercolari. Successivamente, Middlebrook e Cohn migliorarono la formulazione per sviluppare il terreno 7H10, che consentiva una crescita più rapida e rigogliosa delle specie di *Mycobacterium*.

Middlebrook 7H10 Agar (con supplementi OADC e glicerolo) viene utilizzato per l'isolamento, la coltura e il test di sensibilità di *M. tuberculosis*. È stato riportato che il terreno 7H10 tende a far crescere meno contaminanti rispetto ai terreni a base di uova comunemente usati per la coltivazione di micobatteri.

### FORMULA TIPICA\* (Per Litro di Acqua Purificata)

Terreno base	
Acido l-glutammico	0.5 g
Citrato di sodio	0.4 g
Piridossina cloridrato	0.001 g
Biotina	0.0005 g
Citrato di ammonio ferrico	0.04 g
Solfato d'ammonio	0.5 g
Fosfato disodico	1.5 g
Fosfato monopotassico	1.5 g
Solfato di magnesio	0.025 g
Verde malachite	0.00025 g
Agar	15.0 g
Cloruro di calcio	0.0005 ml
Solfato di zinco	0.001 g
Solfato di rame	0.001 g
pH finale 6.6 ± 0.2 a 25°C	

+

Supplemento OADC	
Acido Oleico	0.06 ml
Catalasi	0.003 g
Albumina Bovina (Frazione V)	5.0 g
Glucosio	2.0 g
Sodio Cloruro	0.85 g

OADC: Acido Oleico, Albumina, Destrosio, Catalasi.

Supplemento Glicerolo	
Glicerolo	5.0 ml

\*Adattata e/o integrata per soddisfare le specifiche prestazionali.

### Terreno completo

## Base + Supplementi

Middlebrook 7H10 Agar Base

+

Middlebrook 7H10 (OADC) Supplement

+

Glycerol

Per ottenere la crescita dei micobatteri è necessario aggiungere i supplementi all'agar base.

### **PRINCIPIO DEL METODO**

Acido glutammico, sodio citrato, piridossina, biotina ed ammonio solfato forniscono fattori di crescita. Ammonio citrato ferrico, magnesio solfato, calcio cloruro, zinco solfato e rame solfato sono fonte di ioni. I fosfati aiutano nel mantenimento del pH del terreno. Il verde di malachite è l'agente selettivo che inibisce la flora microbica contaminante. Il verde malachite serve anche come indicatore di pH. L'agar è l'agente solidificante. Glicerolo e glucosio sono fonte di energia. Il sodio cloruro mantiene il bilancio osmotico del terreno. L'albumina protegge i bacilli tubercolari contro gli agenti tossici. La catalasi elimina i perossidi tossici che possono essere presenti nel terreno. L'acido oleico è un acido grasso utilizzato dai micobatteri.

### **PREPARAZIONE**

#### Terreno disidratato

Sospendere 19,5 g di polvere in 900 ml di acqua distillata o deionizzata contenente 5 ml di Glycerol supplement. Riscaldare e bollire fino a completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 45-50°C e aggiungere 100 ml di Middlebrook 7H10 (OADC) supplement. Mescolare bene e versare in contenitori finali sterili (questo terreno è preparato in provette a becco di clarino o piastre).

### **MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

Forniture e apparecchiature microbiologiche standard come: autoclave, piastre Petri sterili, provette, anse da inoculo, tamponi, incubatore, microrganismi per il controllo qualità.

### **CAMPIONI**

I campioni sottoposti a coltura micobatterica rientrano in due categorie: campioni normalmente contaminati da flora residente e campioni provenienti da siti normalmente sterili. I campioni contaminati richiedono una fase di decontaminazione prima della coltura per ridurre la probabilità di crescita eccessiva di organismi diversi dai micobatteri. I campioni devono essere ottenuti prima della terapia antimicrobica (ove possibile) e consegnati prontamente al laboratorio per l'esame.

Fare riferimento alle linee guida specifiche per informazioni più dettagliate.

### **PROCEDURA DEL TEST**

Inoculare il campione trattato sul terreno. Elaborare i campioni clinici il prima possibile. Potrebbe essere necessario concentrare i campioni (ad esempio centrifugazione). A seconda del tipo di campione e del metodo utilizzato, potrebbe essere necessario passare attraverso una o più delle seguenti fasi prima della coltura: omogeneizzazione, digestione/decontaminazione e neutralizzazione.

Tenere le piastre e le provette al riparo dalla luce e incubare a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per un massimo di 8 settimane in atmosfera aerobica arricchita con il 5-10% di anidride carbonica.

Per informazioni più dettagliate, consultare la guida appropriata.

### **INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Esaminare settimanalmente crescita, produzione del pigmento e morfologia delle colonie. Eseguire test identificativi secondo le procedure di laboratorio previste.

### **CONSERVAZIONE**

La polvere è fortemente igroscopica, conservare a 10-30 °C, in ambiente asciutto, nel suo contenitore originale chiuso ermeticamente. Non usare il prodotto dopo la sua data di scadenza indicata sull'etichetta o se il prodotto mostra segni di contaminazione o deterioramento.

Conservare le provette e le piastre preparate a 2-8 °C.

### **VALIDITÀ**

Piastre pronte all'uso: 6 mesi.

Terreno in provette: 1 anno.

Terreno disidratato: 4 anni.

Supplementi: 2 anni.

## CONTROLLO QUALITÀ

**Aspetto del supplemento OADC:** Liquido di colore ambrato, limpido o leggermente opalescente

**Aspetto del supplemento glicerolo:** Sostanza densa incolore di aspetto oleoso.

**Aspetto del terreno disidratato:** Granulometria fine, omogeneo, beige chiaro con sfumature verdi.

**Aspetto del terreno preparato:** Giallastro verde chiaro, leggermente opalescente.

### Risultati Attesi dei Test Colturali:

Ceppi di controllo		Inoculo	Incubazione	Specifiche
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC® 13950	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> UFC	fino a 21 giorni/ 35 ± 2°C/ 5-10% CO <sub>2</sub>	Crescita buona
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	ATCC® 19981			
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup> UFC		Inibizione parziale o completa
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC® 19615			

Fare riferimento al certificato di analisi (CoA) relativo al lotto effettivo.

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Il test delle prestazioni di Middlebrook 7H10 Agar è stato eseguito utilizzando i ceppi QC sopra elencati. I risultati ottenuti hanno soddisfatto i criteri stabiliti.

## LIMITAZIONI

Risultati negativi non escludono la presenza di un'infezione attiva ad opera di micobatteri.

Alcuni dei fattori che possono condurre a colture negative sono:

- Il campione non era rappresentativo del materiale infetto; es. saliva invece che sputo.
- I micobatteri sono stati distrutti durante la digestione e decontaminazione del campione.
- Una contaminazione importante ha interferito con la crescita dei micobatteri.
- Condizioni adeguate di aerobiosi ed aumento della tensione di CO<sub>2</sub> non sono state rispettate durante l'incubazione.

Poiché questo terreno è solo parzialmente selettivo, i batteri diversi dai micobatteri possono crescere se i campioni non vengono opportunamente pretrattati per la decontaminazione.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- 1) **Per uso diagnostico in vitro (IVD).**
- 2) **Solo per uso professionale di laboratorio.**
- 3) Gli operatori devono essere formati e avere una certa esperienza. Si prega di leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il prodotto. L'affidabilità dei risultati del test non può essere garantita in caso di deviazioni dalle istruzioni contenute in questo documento.
- 4) Consultare la scheda di sicurezza (SDS) per informazioni sui pericoli e sulle pratiche di manipolazione sicure.
- 5) Non utilizzare se il prodotto o la confezione sembrano danneggiati.
- 6) Seguire le precauzioni standard. Tutti i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infetti e maneggiati di conseguenza.
- 7) Maneggiare tutti i campioni come infetti utilizzando procedure di laboratorio sicure. Smaltire materiali pericolosi o biologicamente contaminati secondo le pratiche del proprio istituto.
- 8) Evitare la contaminazione incrociata dei campioni utilizzando puntali monouso e sostituendole dopo ogni campione.
- 9) Non mescolare reagenti di lotti diversi. Si prega di utilizzare il prodotto entro il periodo di validità.
- 10) Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto nelle aree in cui vengono manipolati reagenti e campioni umani.
- 11) I risultati devono essere interpretati da un professionista qualificato insieme alla storia del paziente, ai segni e sintomi clinici e ai fattori di rischio epidemiologici.
- 12) Assicurarsi che le apparecchiature di laboratorio siano calibrate e mantenute in conformità con la procedura del laboratorio.
- 13) Quando i risultati dei test vengono trasmessi dal laboratorio a un centro informatico, è necessario prestare attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.

## SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Lo smaltimento dei rifiuti deve essere effettuato in conformità alle normative nazionali e locali in vigore

### **BIBLIOGRAFIA**

Vedere i riferimenti alla fine di questo documento.

### **TABELLA DEI SIMBOLI**

Vedere la tabella dei simboli alla fine di questo documento.

**Il prodotto è disponibile in diverse configurazioni. Vedere l'elenco nella lingua inglese.**

Questo documento IFU e la SDS sono disponibili dal Support Center online:












[liofilchem.com/ifu-sds](https://liofilchem.com/ifu-sds)



## References / Riferimenti

1. Public Health England. (2020). Investigation of specimens for *Mycobacterium* species. UK Standards for Microbiology Investigations. B 40 Issue 7.3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>
2. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M.A. Pfaller (2007) Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (2004) Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard, 3rd ed. M22-A3. CLSI, Wayne, PA
4. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn, Jr. (1997) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
5. Kent, P.T. and G.P. Kubica (1985) Public Health Mycobacteriology, A Guide for the Level III Laboratory. Dept. of H.H.S. and Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, GA.
6. 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.
7. Middlebrook, G., and M.L. Cohn (1958) Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Public Health. 48:844-853.
8. 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.
9. Dubos and Middlebrook. (1947). Am. Rev. Tuberc. 56: 334.

## Table of Symbols / Tabella dei Simboli

	Batch code / Codice del lotto
	Catalogue number / Numero di catalogo
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device / Dispositivo Medico Diagnostico <i>in vitro</i>
	Manufacturer / Fabbricante
	Use by / Utilizzare entro
	Fragile, handle with care / Fragile, maneggiare con cura
	Temperature limitation / Limiti di temperatura
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi
	Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso
	Do not reuse / Non riutilizzare
	Keep away from sunlight / Tenere al riparo dalla luce solare



**Liofilchem® s.r.l.**

Via Scozia, 64026 Roseto degli Abruzzi (TE) Italy

Tel. +39 0858930745

Fax +39 0858930330

[www.liofilchem.com](http://www.liofilchem.com)

[liofilchem@liofilchem.com](mailto:liofilchem@liofilchem.com)

