



## Middlebrook 7H11 + Drug

Solid media for susceptibility testing  
of *Mycobacterium tuberculosis*.

### DESCRIPTION

Middlebrook 7H11 + Drug are agar-based media used for susceptibility testing of *Mycobacterium* spp, especially *Mycobacterium tuberculosis*, from clinical specimens.

The agar containing formula has shown improved susceptibility testing compared to media based on coagulated egg (Lowenstein formulations) where drugs may be more easily inactivated.

The anti-tuberculous drug included and its concentration defines each medium.

| TYPICAL FORMULA             | (g/l)   |
|-----------------------------|---------|
| Pancreatic Digest of Casein | 1.0     |
| L-Glutamic Acid             | 0.5     |
| Sodium Citrate              | 0.4     |
| Pyridoxine Hydrochloride    | 1.0     |
| Biotin                      | 0.0005  |
| Ferric Ammonium Citrate     | 0.04    |
| Ammonium Sulfate            | 0.5     |
| Disodium Phosphate          | 1.5     |
| Monopotassium Phosphate     | 1.5     |
| Magnesium Sulfate           | 0.05    |
| Malachite Green             | 1.0     |
| Agar                        | 15.0    |
| Glycerol                    | 5 ml    |
| Sodium Chloride             | 0.85    |
| Glucose                     | 2.0     |
| Bovine Albumin (Fraction V) | 5.0     |
| Catalase                    | 0.003   |
| Oleic Acid                  | 0.06 ml |
| Drug                        | (*)     |
| Final pH 6.6 ± 0.2 at 25°C  |         |

\* Type of anti-mycobacteria agents and relevant concentrations are shown under the PRESENTATION paragraph.

### METHOD PRINCIPLE

Pancreatic digest of casein is the ingredient added to Middlebrook 7H10 Agar (ref. 30368) to create Middlebrook 7H11 Agar providing nitrogen, vitamins and amino acids to enhance the growth of fastidious strains of *M. tuberculosis*. Glutamic acid, sodium citrate, pyridoxine, biotin and ammonium sulfate supply growth factors. Ferric ammonium citrate and magnesium 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.

### TEST PROCEDURE

Freshly grown primary cultures in Middlebrook 7H9 Broth (ref. 24436) may be used to prepare the inoculum. Strains should be inoculated onto drug-containing media and drug-free Middlebrook 7H11 Agar (ref. 10414, 37000) as control. Keep plates and tubes shielded from light and incubate at 37 ± 1°C for up to 3 weeks in aerobic atmosphere enriched with 5-10% carbon dioxide.

For more information on how to perform the susceptibility testing of mycobacteria refer to current CLSI guidelines and recommendations by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

### INTERPRETING RESULTS

Examine weekly for growth. The pathobiology of *M. tuberculosis* complex (MTBC, i.e. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*) differs from that of many other bacteria. So, refer to the above mentioned guidelines for interpretation.

### APPEARANCE

Slightly opalescent, light yellowish green.

### STORAGE

Store at 2-8°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

### SHELF LIFE

4 months.

**QUALITY CONTROL**

The medium is inoculated with the microbial strains indicated in the QC table.

Inoculum: 1 McFarland turbidity standard.

Incubation conditions: aerobic atmosphere with 5-10%CO<sub>2</sub> at 37 ± 1°C for up to 21 days.

**QC Table.**

| Microorganism                                       | Growth    |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC® 25177 | Inhibited |

**WARNING AND PRECAUTIONS**

The product does not contain hazardous substances in concentrations exceeding the limits set by current legislation and therefore is not classified as dangerous. It is nevertheless recommended to consult the safety data sheet for its correct use. The product is intended for *in vitro* diagnostic use and must be used only by properly trained operators.

**DISPOSAL OF WASTE**

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

**BIBLIOGRAPHY**

- Salman et al (2012) Direct Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* for Rapid Detection of Multidrug Resistance Using the Bactec MGIT 960 System: a Multicenter Study. J Clin Microbiol. 502: 435-440.
- Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M.A. Pfaller (2007) Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2004) Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard, 3<sup>rd</sup> ed. M22-A3. CLSI, Wayne, PA
- National Committee for Clinical Laboratory Standards(2003) Document M24-A. Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. NCCLS, Wayne, PA.
- 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. 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Shaberg T, Reichert B, Schulin T, Lode H, Mauch H (1995) Rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using conventional solid media. Eur Respir J. 8:1688-93.
- 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.
- 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.
- Middlebrook, G., and M.L. Cohn (1958) Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Public Health. 48:844-853.
- 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.

| PRESENTATION                                             | Contents    | Ref.              |
|----------------------------------------------------------|-------------|-------------------|
| Middlebrook 7H11 + Amikacin 2 µg/ml                      | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Amikacin 4 µg/ml                      | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Ethambutol 7.5 µg/ml                  | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Ethionamide 10 µg/ml                  | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Isoniazid 0.2 µg/ml                   | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Isoniazid 1 µg/ml                     | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Kanamycin 6 µg/ml                     | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + <i>p</i> -Aminosalicylic acid 8 µg/ml | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Pyrazinamide 25 µg/ml                 | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Rifabutin 1 µg/ml                     | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Rifabutin 0.5 µg/ml                   | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Rifampicin 1 µg/ml                    | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Streptomycin 2 µg/ml                  | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |
| Middlebrook 7H11 + Ofloxacin 2 µg/ml                     | Slant tubes | 10 x 8.5 ml tubes |

**TABLE OF SYMBOLS**

|                             |                                                                                                            |                                                                                                                       |                                                                                                                          |                                                                                                                 |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>LOT</b> Batch code       | <b>IVD</b> <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device                                                       |  Manufacturer                      |  Use by                               |  Fragile, handle with care |
| <b>REF</b> Catalogue number |  Temperature limitation |  Contains sufficient for <n> tests |  Caution, consult Instruction For Use |  Do not reuse              |



**LIOFILCHEM® s.r.l.**

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy

Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330

www.liofilchem.net

liofilchem@liofilchem.net





## Middlebrook 7H11 + Drug

Terreno solido per i test di sensibilità  
per *Mycobacterium tuberculosis*.

### DESCRIZIONE

Middlebrook 7H11 + Drug sono terreni contenenti agar utilizzati per i test di sensibilità per specie di *Mycobacterium*, in particolare *Mycobacterium tuberculosis*, da campioni clinici.

La formula con agar ha dimostrato risultati migliorati per i test di sensibilità rispetto ai terreni a base di uovo coagulato (formula Lowenstein) dove gli antimicrobici possono essere più facilmente inattivati.

Il farmaco anti-tuberculosis incluso e la sua concentrazione definisce ciascun terreno.

### FORMULA TIPICA

|                                 | (g/l)   |
|---------------------------------|---------|
| Digerito Pancreatico di Caseina | 1.0     |
| L-Acido Glutammico              | 0.5     |
| Sodio Citrato                   | 0.4     |
| Piridossina Cloridrato          | 1.0     |
| Biotina                         | 0.0005  |
| Ferro Ammonio Citrato           | 0.04    |
| Ammonio Solfato                 | 0.5     |
| Disodio Fosfato                 | 1.5     |
| Potassio Fosfato Monobasico     | 1.5     |
| Magnesio Solfato                | 0.05    |
| Verde Malachite                 | 1.0     |
| Agar                            | 15.0    |
| Glicerolo                       | 5 ml    |
| Sodio Cloruro                   | 0.85    |
| Glucosio                        | 2.0     |
| Albumina Bovina (Frazione V)    | 5.0     |
| Catalasi                        | 0.003   |
| Acido Oleico                    | 0.06 ml |
| Farmaco                         | (*)     |
| pH Finale $6.6 \pm 0.2$ a 25°C  |         |

\* Tipo di agenti anti-micobatteri e relative concentrazioni sono mostrate sotto il paragrafo PRESENTAZIONE.

### PRINCIPIO DEL METODO

Il digerito pancreatico di caseina è l'ingrediente che viene aggiunto al terreno Middlebrook 7H10 Agar (ref. 30368) per realizzare Middlebrook 7H11 Agar e che fornisce azoto, vitamine ed aminoacidi per stimolare la crescita dei ceppi esigenti di *M. tuberculosis*. Acido glutammico, sodio citrato, piridossina, biotina ed ammonio solfato forniscono fattori di crescita. Ammonio citrato ferrico e magnesio 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.

### PROCEDURA DEL TEST

Per preparare l'inoculo si possono utilizzare colture primarie fresche ottenute in Middlebrook 7H9 Broth (ref. 24436). I ceppi dovrebbero essere inoculati sia sul terreno contenente il farmaco che su Middlebrook 7H11 Agar (ref. 10414, 37000), senza il farmaco, da utilizzare come controllo. Tenere le piastre e le provette al riparo dalla luce ed incubare a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  fino ad 3 settimane in atmosfera aerobica arricchita con 5-10% di anidride carbonica.

Per maggiori informazioni su come eseguire il test di sensibilità per i micobatteri far riferimento alle linee guida CLSI aggiornate e alle raccomandazioni del Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Esaminare la crescita settimanalmente. La patobiologia del complesso *M. tuberculosis* (MTBC, i.e. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*) differisce da quella di molti altri batteri. Quindi, far riferimento alle sopra menzionate linee guida per l'interpretazione.

### ASPETTO

Giallastro verde chiaro, leggermente opalescente.

### CONSERVAZIONE

Conservare a 2-8°C al riparo dalla luce. Non usare il prodotto dopo la sua data di scadenza indicata sull'etichetta o se il prodotto mostra segni di contaminazione o deterioramento.

### VALIDITÀ

4 mesi.

**CONTROLLO DI QUALITÀ**

Il terreno viene inoculato con i ceppi microbici indicati nella tabella CQ.

Inoculo: torbidità di riferimento 1 McFarland.

Condizioni di incubazione: ambiente aerobico con 5-10%CO<sub>2</sub> a 37 ± 1°C fino a 21 giorni.

**Tabella CQ.**

| Microrganismo                                       | Crescita |
|-----------------------------------------------------|----------|
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC® 25177 | Inibita  |

**AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

Il prodotto non contiene sostanze nocive in concentrazioni superiori ai limiti fissati dall'attuale legislazione e perciò non è classificato come pericoloso. Ciononostante si raccomanda di consultare la scheda di sicurezza per il suo corretto uso. Il prodotto è da intendersi per uso diagnostico *in vitro* e deve essere utilizzato esclusivamente da operatori adeguatamente addestrati.

**SMALTIMENTO DEI RIFIUTI**

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

**BIBLIOGRAFIA**

- Salman et al (2012) Direct Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* for Rapid Detection of Multidrug Resistance Using the Bactec MGIT 960 System: a Multicenter Study. J Clin Microbiol. 502: 435-440.
- Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M.A. Tenover (2007) Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2004) Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard, 3<sup>rd</sup> ed. M22-A3. CLSI, Wayne, PA
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) Document M24-A. Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. NCCLS, Wayne, PA.
- 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. 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Shaberg T, Reichert B, Schulz T, Lode H, Mauch H (1995) Rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using conventional solid media. Eur Respir J. 8:1688-93.
- 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.
- 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.
- Middlebrook, G., and M.L. Cohn (1958) Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Public Health. 48:844-853.
- 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.

**PRESENTAZIONE**

|                                                          | Contenuto                                     | Ref.  |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|
| Middlebrook 7H11 + Amikacin 2 µg/ml                      | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37001 |
| Middlebrook 7H11 + Amikacin 4 µg/ml                      | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37002 |
| Middlebrook 7H11 + Ethambutol 7.5 µg/ml                  | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37006 |
| Middlebrook 7H11 + Ethionamide 10 µg/ml                  | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37011 |
| Middlebrook 7H11 + Isoniazid 0.2 µg/ml                   | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37016 |
| Middlebrook 7H11 + Isoniazid 1 µg/ml                     | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37017 |
| Middlebrook 7H11 + Kanamicin 6 µg/ml                     | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37021 |
| Middlebrook 7H11 + <i>p</i> -Aminosalicylic acid 8 µg/ml | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37026 |
| Middlebrook 7H11 + Pyrazinamide 25 µg/ml                 | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37031 |
| Middlebrook 7H11 + Rifabutin 1 µg/ml                     | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37036 |
| Middlebrook 7H11 + Rifabutin 0.5 µg/ml                   | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37037 |
| Middlebrook 7H11 + Rifampicin 1 µg/ml                    | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37041 |
| Middlebrook 7H11 + Streptomycin 2 µg/ml                  | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37046 |
| Middlebrook 7H11 + Ofloxacin 2 µg/ml                     | Provette a becco di clarino 10 x 8.5 ml tubes | 37051 |

**TABELLA DEI SIMBOLI**

|                               |                                                           |                                     |                                                |                              |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>LOT</b> Codice del lotto   | <b>IVD</b> Dispositivo Medico Diagnostico <i>in vitro</i> | Fabbricante                         | Utilizzare entro                               | Fragile, maneggiare con cura |
| <b>REF</b> Numero di catalogo | Limiti di temperatura                                     | Contenuto sufficiente per <n> saggi | Attenzione, Consultare le istruzioni per l'uso | Non riutilizzare             |



**LIOFILCHEM® s.r.l.**

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy

Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330

www.liofilchem.net

liofilchem@liofilchem.net

