

**MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE**
**I EINFÜHRUNG**

**BD BBL Seven H11 Agar** ist ein Kulturmedium zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien.

**II TESTDURCHFÜHRUNG**

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
  - a) Vor der Inokulation sicherstellen, dass die Platten keinerlei Feuchtigkeit aufweisen.
  - b) Die Platten zur Isolierung mit einer auf  $10^3$ – $10^4$  KBE verdünnten Kultur ausstreichen.
  - c) Die Platten bei  $35 \pm 2$  °C in einer mit Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre inkubieren.
2. Die Platten nach 7 bis 21 Tagen im Hinblick auf Wachstum und Pigmentierung untersuchen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

Organismen	ATCC -Stämme	Isolierung
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Mäßiges bis starkes Wachstum
* <i>Mycobacterium kansasii</i> Gruppe I	12478	Wachstum
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , Gruppe II	19981	Wachstum
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , Gruppe III	13950	Wachstum
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , Gruppe IV	6841	Wachstum

\* Empfohlener Organismusstamm für die Qualitätssicherung durch den Anwender.

**HINWEIS:** Muss vom Anwender gemäß CLSI M22-A3 überwacht werden.

**III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE**

1. Die Platten wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben untersuchen.
2. Die repräsentativen Platten im Hinblick auf Beschädigungen sichtbar prüfen, durch die ihre Verwendung beeinträchtigt werden könnte.
3. Den pH-Wert potentiometrisch bei Raumtemperatur überprüfen, um festzustellen ob die Spezifikation von  $6,6 \pm 0,2$  eingehalten wird.
4. Die Festigkeit der Agarplatten während der Inokulation beachten.
5. Unbeimpfte repräsentative Platten 72 h lang bei  $35 \pm 2$  °C inkubieren und im Hinblick auf mikrobielle Kontamination untersuchen.

**PRODUKTINFORMATIONEN**
**IV VERWENDUNGSZWECK**

**BD BBL Seven H11 Agar** dient zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien bei qualitativen Verfahren. Die Platten werden tieflegend gefüllt, um bei längerer Inkubation Austrocknungseffekte zu reduzieren.

**V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG**

Für die Kultivierung von Mykobakterien wurden bereits zahlreiche Kulturmedien entwickelt. Die frühen Medien, darunter das Löwenstein-Jensen- und das Petragnani-Medium, waren Formulierungen auf Eibasis. Dubos und Middlebrook waren maßgeblich an der Entwicklung einer Reihe von Formulierungen beteiligt, die – vornehmlich durch ihren Ölsäure- und Albumin-Gehalt – das Wachstum der Tuberkelbazillen förderten und diese Organismen gegen verschiedene toxische Wirkstoffe schützten.<sup>1</sup> Später optimierten Middlebrook und Cohn die Formulierung des Ölsäure-Albumin-Agars und erzielten so ein rascheres, üppigeres Wachstum der Mykobakterium-Spezies auf ihrem als 7H10 bezeichneten Medium.<sup>2,3</sup>

Cohn et al. modifizierten die 7H10 Agar-Formulierung durch den Zusatz eines Gramms pankreatisch abgebauten Caseins pro Liter, um das Wachstum derjenigen *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme zu fördern, die auf 7H10 und anderen herkömmlichen Isolierungsmedien schlechtes (oder gar kein) Wachstum zeigten.<sup>4</sup> Diese Formulierung wird als **BD BBL Seven H11 Agar** (Sieben-H11-Agar) bezeichnet. Bei einer von Cohn et al. durchgeführten Studie zeigten 13 von 96 klinischen Isolaten in den ersten drei Wochen kein Wachstum auf dem 7H10-Medium. Zehn der 13 Kulturen wuchsen innerhalb von drei Wochen auf Seven H11; die übrigen drei erforderten eine weitere dreiwöchige Inkubation, bevor Wachstum sichtbar wurde.<sup>4</sup>

**VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN**

**BD BBL Seven H11 Agar** enthält verschiedene anorganische Salze, welche wichtige Substanzen für das Mykobakterienwachstum liefern. Das Natriumcitrat sorgt nach seiner Umwandlung in Zitronensäure dafür, dass bestimmte anorganische Kationen gelöst bleiben. Glycerin ist eine ergiebige Kohlenstoff- und Energiequelle. Das pankreatisch abgebaute Casein ist eine reichhaltige Stickstoffquelle für das Wachstum der Tuberkelbazillen und enthält eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren.<sup>1</sup> Tuberkelbazillen können Ölsäure sowie andere langkettige Fettsäuren verarbeiten, so dass diese Substanzen eine wichtige Rolle für den Mykobakterienstoffwechsel spielen. Katalase zerstört evtl. im Medium vorhandene toxische Peroxide. Die primäre Wirkung von Albumin besteht im Schutz der Tuberkelbazillen gegen toxische Wirkstoffe, weshalb diese Substanz die Gewinnung von Bazillen bei der Erstisolierung erhöht. Eine teilweise Hemmung des Bakterienwachstums wird durch den Farbstoff Malachitgrün erzielt.

## VII REAGENZIEN

### BD BBL Seven H11 Agar

Ungefähre Zusammensetzung\* pro L destilliertem Wasser

Pankreatisch abgebautes Casein .....	1,0 g	Rinderalbumin V .....	5,0 g
Magnesiumsulfat .....	0,05 g	Katalase .....	3,0 mg
Ammonium Eisen (III)-Citrat .....	0,04 g	Pyridoxin .....	1,0 mg
Natriumcitrat .....	0,4 g	Zinksulfat .....	1,0 mg
Ammoniumsulfat .....	0,5 g	Kupfersulfat .....	1,0 mg
Mononatriumglutamat .....	0,5 g	Biotin .....	0,5 mg
Dinatriumphosphat .....	1,5 g	Calciumchlorid .....	0,5 mg
Kaliumdihydrogenphosphat .....	1,5 g	Malachitgrün .....	0,25 mg
Agar .....	13,5 g	Ölsäure .....	0,06 mL
Natriumchlorid .....	0,85 g	Glyzerin .....	5,0 mL
Dextrose .....	2,0 g		

\*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

*In-vitro*-Diagnostikum.

Wenn übermäßige Feuchtigkeit vorhanden ist, das Unterteil umdrehen, versetzt auf einen Deckel legen und an der Luft trocknen lassen, um zu verhindern, dass während der Inkubation eine Abdichtung zwischen dem Deckel und dem Unterteil der Platte entsteht.

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“<sup>5–8</sup> sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Gebrauchsfertige Platten, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach der Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Beim Arbeiten mit klinischen Proben, bei denen keine Aerosole entstehen – wie bei der Herstellung von säurefesten Abstrichen – sind Laborpraktiken und Verfahren sowie Sicherheitsvorrichtungen der Biosicherheitsstufe 2 erforderlich. Alle Arbeiten, bei denen Aerosole entstehen, müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse I oder II durchgeführt werden. Verfahren, Behälter und Einrichtungen der biologischen Sicherheitsstufe 3 sind für Laboraktivitäten mit Propagierung und Manipulation von *M. tuberculosis*- und *M. bovis*-Kulturen einzusetzen. Darüber hinaus erfordern Tierstudien ebenfalls besondere Verfahren.<sup>7</sup>

### Aufbewahrung

Die Platten nach Erhalt im Dunkeln bei 2–8 °C lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Gebrauchsfertige Platten, die bis zur Verwendung in der Originalverpackung bei 2–8 °C aufbewahrt wurden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und für die empfohlene Inkubationsdauer inkubiert (Mycobakteriologie-Medien: bis zu 2 Wochen) werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

### Haltbarkeit des Produkts

Die Platten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

## VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für die Probenentnahme wurden verschiedene Tupfer und Behälter entwickelt. Die Proben sollten vor der Anwendung von Antibiotika gewonnen werden. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen. Um in Fällen, bei denen zwischen der Entnahme und der definitiven Kultivierung voraussichtlich eine längere Zeitspanne liegen wird, die Überlebensdauer der Mikroorganismen zu verlängern, wurden mehrere Aufbewahrungsmedien oder Transportsysteme entwickelt, wie bspw. die **BD BBL** -Entnahme- und -Transportprodukte. Einzelheiten zur Probenentnahme und -handhabung sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.<sup>9,10</sup>

## IX VERFAHREN

### Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

**BD BBL** Seven H11 Agar (Deep Fill)

### Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

### Testverfahren

Die Agaroberfläche sollte glatt und feucht sein, jedoch keine überschüssige Feuchtigkeit aufweisen.

Bei den Testverfahren handelt es sich um die von den CDC (Centers for Disease Control and Prevention) für die Erstisolierung von Mykobakterien enthaltenden Proben empfohlenen Verfahren.<sup>11</sup> N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid-Lösung (NALC-NaOH-Lösung) wird als sanftes jedoch wirksames Aufschluss- und Dekontaminationsmittel empfohlen.<sup>1</sup> Diese Reagenzien sind im **BD MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit (Mykobakterienproben-Aufschluss-/Dekontaminationskit) enthalten. Nähere Informationen zur Dekontamination und Kultivierung finden Sie in der entsprechenden Literatur.<sup>9-12</sup>

Die Platten nach der Inokulation vor Licht schützen und mit der Mediumseite nach unten in ein **BD GasPak** EZ-System oder ein sonstiges geeignetes System geben, das eine mit Kohlendioxid angereicherten aerobe Atmosphäre bietet, und bei 35 ± 2 °C inkubieren.

**HINWEIS** Für Kulturen von Hautläsionen, bei denen es sich vermutlich um *M. marinum* oder *M. ulcerans* handelt, sollte eine Erstinkubation bei 25 bis 33 °C erfolgen; Kulturen, die vermutlich *M. avium* oder *M. xenopi* enthalten, zeigen bei 40 bis 42 °C optimales Wachstum.<sup>11</sup> Eine Duplikatkultur bei 35 bis 37 °C inkubieren.

### Qualitätssicherung durch den Anwender

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

## X ERGEBNISSE

Die Platten können innerhalb von 5 bis 7 Tagen nach der Inokulation abgelesen werden sowie anschließend bis zu 8 Wochen lang einmal wöchentlich.

Die Platten zum Ablesen umgedreht auf der Objektplatte eines Seziermikroskops platzieren. Bei einer Vergrößerung von 10–60x unter Transmissionslicht ablesen. Bei einer Vergrößerung von 10–20x rasch im Hinblick auf das Vorliegen von Kolonien untersuchen. Stärkere Vergrößerungen (30–60x) sind hilfreich für das Studium der Koloniemorphologie, d.h. von serpentinenartigen Strangkolonien.

Die Beobachtungen aufzeichnen:<sup>11</sup>

1. Anzahl der Tage bis zum makroskopischen Sichtbarwerden der Kolonien.
2. Anzahl der Kolonien:  
Keine Kolonien = negativ  
Weniger als 50 Kolonien = tatsächliche Anzahl  
50–100 Kolonien = 1+  
100–200 Kolonien = 2+  
Nahezu konfluierend (200–500) = 3+  
Konfluierend (mehr als 500) = 4+
3. Pigmentbildung  
Weiß, cremefarben oder lederfarben = nicht chromogen (NC)  
Zitronenfarben, gelb, orange, rot = chromogen (Ch)

Gefärbte Ausstriche können säurefeste Bazillen aufweisen, welche lediglich als „säurefeste Bazillen“ auszugeben sind, sofern keine definitiven Tests durchgeführt werden.<sup>11</sup>

## XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Diese Medium ist für die Erstisolierung vorgesehen. Für biochemische Tests und serologische Verfahren wird jedoch die Verwendung einer Reinkultur empfohlen. Weitere Informationen sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.<sup>9–13</sup>

## XII LEISTUNGSMERKMALE

Bei einer von Rastogi et al. am Pasteur-Institut durchgeführten Studie waren die Ergebnisse der Medikamentenempfindlichkeitsprüfung für 7H11 Agar denen einer mit dem **BD BACTEC** 460TB-System durchgeführten radiometrischen Methode vergleichbar.

Außerdem rechtfertigte die Untersuchung die Bevorzugung von 7H11 Agar gegenüber Löwenstein-Jensen-Agar für herkömmliche Medikamentenempfindlichkeitsprüfungen.<sup>14</sup>

## XIII LIEFERBARE PRODUKTE

### Best.- Nr. Beschreibung

221870 **BD BBL** Seven H11 Agar (Deep Fill)

## XIV LITERATUR

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. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 98:295–296.
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. Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. 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. Tover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
12. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Soubolle, 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.
13. Isenberg, H.D., F.D. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. *Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens*. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Rastogi, N., K.S. Goh, and H.L. David. 1989. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion methods using Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 Agar media and a radiometric method. *Res. Microbiol.* 140:405–417.

Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung in Verbindung oder besuchen Sie [www.bd.com](http://www.bd.com).



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.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.