BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

L007467 • Rev. 12 • Oktober 2015

MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE (Optional)

I EINFÜHRUNG

Middlebrook-7H9-Bouillon mit Glycerol ist ein nichtselektives Kulturmedium zur Kultivierung von Mykobakterien.

II LEISTUNGSTESTVERFAHREN

A. Verfahren zur Herstellung von Inokula

1. Löwenstein-Jensen-Medium, Schrägagars mithilfe von sterilen Inokulationsstäbchen mit Stammkulturen der entsprechenden mykobakteriellen Stämme inokulieren.
2. Die Röhrchen mit locker aufgesetzten Kappen in einer aeroben Atmosphäre unter Zusatz von Kohlendioxid (5-10%) bei 35 ± 2 °C inkubieren, bis starkes Wachstum zu beobachten ist (üblicherweise innerhalb von 2 bis 3 Wochen).
3. Das Wachstum mit einem sterilen, geschärften Applikatorstäbchen entnehmen. Hierzu die Zellen von der Oberfläche des Mediums vorsichtig entfernen und darauf achten, dass zusammen mit den Zellen nicht versehentlich auch Kulturmedium entnommen wird.
   a) Für *Mycobakterium tuberculosis* (ATCC 25177):
      (1) Das Wachstum auf 5,0 mL Middlebrook-7H9-Bouillon mit Glycerol in ein steriles Glasröhrchen mit Schraubverschluss und sterilen Glasperlen transferieren.
      (2) Gut durchmischen (mehrere Minuten), bis die Suspension frei von großen Klumpen ist.
      (3) Diese Suspension mit einem McFarland-Nephelometer-Standard Nr. 1 vergleichen. Die Suspension sollte trüber sein als der Standard.
      (4) Das Röhrchen 2 bis 3 h lang bei Raumtemperatur in ein Gestell geben, damit sich die großen Partikel am Boden absetzen können.
      (5) Den Überstand in einen sterilen Behälter transferieren.
      (6) Die Trübheit der Suspension auf den McFarland-Standard Nr. 1 (10^8 KBE/mL) einstellen. Hierzu langsam sterile Middlebrook-7H9-Bouillon mit Glycerol zugeben. Gut schütteln.
      (7) Vor Gebrauch auf 10^5 KBE/mL verdünnen. Gut durchmischen und das Testmedium mit einer auf 0,01 mL kalibrierten Impföse inokulieren.
   b) Für alle anderen mykobakteriellen Stämme:
      (1) Das Wachstum in ein steriles 50-mL-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss transferieren, das 8 bis 12 sterile Glasperlen (2-mm-Durchmesser) und 5 mL Mykobakterium-Verdünnung enthält, die wie folgt präpariert ist:
         - Folgende Bestandteile in einem 1L-Glaskolben mischen und den pH-Wert einstellen. Dabei 1 N Natriumhydroxid mit einem pH-Wert von 6,7 bis 7,0 verwenden.

Rinderalbumin (fettsäurefrei)	1,0	g
Polysorbat 80	0,1	mL
Destilliertes Wasser	500	mL

         - Durch Membranfiltrierung (0,2-µ-Filter) sterilisieren
         - Unter aseptischen Bedingungen in Mengen zu 5,5 mL in sterile Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss geben.
      (2) Das mykobakterielle Wachstum mit einem Applikatorstäbchen an den Seitenwänden eines Zentrifugenröhrchens mit Schraubverschluss emulgieren. Das Wachstum mit dem Verdünnungsmittel vermischen.
      (3) Das Röhrchen verschließen und ca. 10 Min in einem Vortex-Mischer durchmischen, bis das Wachstum gut suspendiert und frei von großen Klumpen ist.
      (4) 15 mL sterile Mykobakterium-Verdünnung zugeben und gründlich durchmischen.
      (5) Diese Suspension mit einem McFarland-Nephelometer-Standard Nr. 1 vergleichen. Die Suspension sollte trüber sein als der Standard.
      (6) Das Röhrchen 2 bis 3 h lang bei Raumtemperatur in ein Gestell geben, damit sich die großen Partikel am Boden absetzen können.

(7) Den Überstand aspirieren und in einen sterilen Behälter transferieren. Die Suspension muss eine stärkere Trübung aufweisen als der McFarland-Standard Nr. 1 und frei sein von großen Partikeln. Wenn noch immer große Partikel vorhanden sind, mischen und dann eine weitere Stunde stehen lassen. Den Überstand in einen sterilen Behälter transferieren.
(8) Die Trübheit der Suspension auf den McFarland-Standard Nr. 1 (10^8 KBE/mL) einstellen. Hierzu langsam sterile Mykobakterium-Verdünnung zugeben. Gut schütteln.
(9) Kleinere Mengen der Suspension in für den Gefrierschrank geeignete Fläschchen geben und mit der Bezeichnung des Organismus und dem Herstellungsdatum beschriften.
(10) Die Suspension einfrieren. Hierzu die Fläschchen in einem Niedrigtemperatur-Gefrierschrank bei –60 °C aufbewahren. Die Fläschchen können bis zu 6 Monate aufbewahrt werden.
(11) Zum Gebrauch das gefrorene Fläschchen aus dem Gefrierschrank entnehmen und den Inhalt schnell auftauen, indem das Röhrchen in ein Wasserbad mit 30 – 35 °C gegeben wird. Vor Gebrauch auf 10^5 KBE/mL verdünnen. Gut durchmischen und das Testmedium mit einer auf 0,01 mL kalibrierten Impföse inokulieren.

B. Verfahren zum Testen des Mediums

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
   a) Die Röhrchen mit sterilen, auf 0,01 mL kalibrierten Einmal-Impfösen mit den wie oben beschrieben präparierten Kulturen inokulieren.
   b) Die Röhrchen mit locker aufgesetzten Kappen in einer aeroben Atmosphäre unter Zusatz von Kohlendioxid bei 35 ± 2 °C inkubieren.
2. Die Röhrchen oder Fläschchen nach 7, 14 und gegebenenfalls nach 21 Tagen auf Wachstum und Pigmentierung überprüfen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

CLSI-Kontrollorganismen
**Mycobacterium tuberculosis*..... Wachstum
H37Ra ATCC 25177
**Mycobacterium kansasii,*..... Wachstum
Gruppe I ATCC 12478
**Mycobacterium scrofulaceum,*..... Wachstum
Gruppe II ATCC 19981
**Mycobacterium intracellulare,*..... Wachstum
Gruppe III ATCC 13950
**Mycobacterium fortuitum,*..... Wachstum
Gruppe IV ATCC 6841

* Empfohlener Stamm des Mikroorganismus zur Qualitätssicherung durch den Anwender.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

1. Röhrchen wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.
2. Röhrchen stichprobenweise visuell auf Beschädigungen und Unregelmäßigkeiten überprüfen, um sicherzustellen, dass diese die spätere Nutzung nicht beeinträchtigen können.
3. Nicht inokulierte Röhrchen stichprobenweise bei 20 – 25 °C und bei 30 – 35 °C aerob inkubieren und nach 7 Tagen auf Kontamination durch Mikroorganismen überprüfen.

PRODUKTINFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

Middlebrook-7H9-Bouillon mit Glycerol ist ein Zusatzmedium, das das Wachstum von Mykobakterien, einschließlich *M. tuberculosis*, fördert. Es wird primär für das Wachstum von Mykobakterien in Reinkultur bei Laboruntersuchungen eingesetzt.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Middlebrook et al entwickelten die 7H9-Bouillon-Bais-Formulierung zur gleichen Zeit wie auch die 7H10-Agarbase.[1-3] Beide Medien fördern das Wachstum mykobakterieller Spezies unter Zugabe von Nährstoffen wie Glycerol, Ölsäure, Albumin und Dextrose; eine Ausnahme bildet *M. bovis*, die durch Glycerol gehemmt wird.

Dieses Medium wird zur Herstellung von Inokula für Antibiotikatests, als basisches Medium für biochemische Tests und zum Anlegen von Subkulturen von Stammkulturen verwendet.

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Die hohe Anzahl anorganischer Salze in diesem Medium liefert Substanzen, die äußerst wichtig für das Wachstum von Mykobakterien sind. Natriumcitrat hält bestimmte anorganische Kationen in der Lösung, wenn es in Zitronensäure umgewandelt wird. Natriumchlorid, Rinderalbumin, Dextrose und Katalase sind Bestandteile der Middlebrook-ADC-Anreicherung. Das Albumin fungiert als Schutz, indem es freie Fettsäuren, die für die *Mycobacterium*-Spezies toxisch sein könnten, bindet. Katalase zerstört toxische Peroxide, die im Medium vorhanden sein können. Dextrose ist ein Energielieferant. Natriumchlorid liefert wichtige Elektrolyte. Durch die Zugabe von Glycerol wird das Wachstum von Mykobakterien gefördert.

VII REAGENZIEN

Middlebrook 7H9 Broth

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

Kaliumdihydrogenphosphat	2,0	g
Dinatriumphosphat	1,5	g
Mononatriumglutamat	0,5	g
Natriumcitrat	0,1	g
Ammoniumsulfat	0,5	g
Pyridoxin	0,001	g
Ammoniumeisen (III)-Citrat	0,04	g
Magnesiumsulfat	0,05	g
Zinksulfat	0,001	g
Kupfersulfat	0,001	g
Biotin	0,5	mg
Calciumchlorid	0,5	mg

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

Das vollständige Medium in präparierten Röhrchen enthält, zusätzlich zu den oben aufgeführten Bestandteilen, pro Liter 2 mL Glycerol und die Bestandteile der ADC-Anreicherung, genauer gesagt:

Natriumchlorid	0,85	g
Rinderalbumin (Fraktion V)	5,0	g
Dextrose	2,0	g
Katalase	4,0	mg
Natriumpyruvat	1,0	g

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Röhrchen mit fest sitzenden Verschlusskappen sind vorsichtig zu öffnen, um Verletzungen aufgrund von Glasbruch zu vermeiden.

Die Methoden und Verfahren sowie die Behälter und Einrichtungen der biologischen Sicherheitsstufe 2 sind für Manipulationen klinischer Proben, bei denen keine Aerosole entstehen, erforderlich, wie beispielsweise bei der Vorbereitung von säurefesten Ausstrichen. Alle Aktivitäten, bei denen Aerosole entstehen, müssen an einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse I oder II durchgeführt werden. Verfahren, Behälter und Einrichtungen der biologischen Sicherheitsstufe 3 sind für Laboraktivitäten zur Vermehrung und Manipulation von *M. tuberculosis*- und *M. bovis*-Kulturen einzusetzen. Darüber hinaus erfordern Tierstudien ebenfalls besondere Verfahren.4

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen und Anwendung aseptischer Techniken erfolgen. Präparierte Röhrchen, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Röhrchen nach Erhalt bei 2 – 8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder überhitzen. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Gemäß der Kennzeichnung in Röhrchen aufbewahrte Medien können bis zum Verfallsdatum inokuliert und für die empfohlene Inkubationsdauer inkubiert (Mykobakteriologie-Medien: bis zu 2 Wochen) werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

Haltbarkeit des Produkts

Röhrchen bei Anzeichen von Kontamination durch andere Mikroorganismen, Verfärbung, Eintrocknen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Kultivierbare Proben können auf unterschiedliche Weise gehandhabt werden. Detaillierte Informationen sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.[5,6] Die Probenentnahme sollte vor der Verabreichung von Antibiotika erfolgen. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial
Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial
Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren
Antiseptische Vorsichtmaßnahmen beachten.

Die Röhrchen nach der Inokulation in einem geeigneten System aufbewahren, das eine aerobe Atmosphäre, angereichert mit 5-10 % Kohlendioxid bietet. Bis zu 8 Wochen bei 35 ± 2 °C inkubieren. Die Verschlusskappen der Röhrchen die ersten 3 Wochen locker aufgesetzt lassen, um eine Zirkulation des Kohlendioxids für den Wachstumsbeginn zu ermöglichen. Die Kappen anschließend festdrehen, um eine Dehydrierung zu verhindern. Ein Mal pro Woche für einen kurzen Zeitraum lösen.

Qualitätssicherung durch den Anwender
Siehe „Qualitätskontrollverfahren".

Jede Mediencharge wurde gemäß entsprechenden Qualitätskontrollorganismen getestet und dieser Test erfüllt die Produktspezifikationen und die zutreffenden CLSI-Standards. Wie immer sollten Qualitätskontrolltests unter Einhaltung der kommunal, landesweit und/oder bundesweit geltenden Vorschriften, der Zulassungsbestimmungen und/oder der Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen.

X ERGEBNISSE

Die Kulturen sollten innerhalb von 5 bis 7 Tagen nach der Inokulation und anschließend bis zu 8 Wochen wöchentlich überprüft werden. Mykobakterielles Wachstum aus den Bouillonröhrchen kann nach Bedarf für weitere Laboruntersuchungen verwendet werden.

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Zum Nachweis müssen die Organismen in Reinkultur vorhanden sein. Für die endgültige Identifizierung sollten morphologische, biochemische oder serologische Tests durchgeführt werden. Für umfassende Informationen und empfohlene Verfahren die entsprechenden Fachliteratur konsultieren.[5-7]

XII LEISTUNGSMERKMALE

Vor der Freigabe werden alle Chargen von Middlebrook-7H9-Bouillon mit Glycerol auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Repräsentative Proben der Charge werden mit einer auf 0,01 mL kalibrierten Impföse mit Kulturen inokuliert, die so weit verdünnt wurden, dass sie 10^3 KBE auf 0,01 mL *Mycobacterium kansasii* Gruppe I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Gruppe II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Gruppe III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Gruppe IV (ATCC 6841) und *M. tuberculosis* (ATCC 25177) enthalten. Nach der Inokulation werden die Röhrchen mit locker aufgesetzten Kappen bei 35 ± 2 °C in einer aeroben Atmosphäre unter Zusatz von 5 – 10 % Kohlendioxid inkubiert. Die Röhrchen nach einer Inkubationszeit von 7, 14 und 21 Tagen auf Wachstum überprüfen. Alle Organismen zeigen innerhalb von 21 Tagen ein mäßiges bis starkes Wachstum.

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr. Beschreibung

221832 **BD BBL** Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5-mL

XIV LITERATUR

1. Middlebrook, G. 1955. Fitzsimmons Army Hospital Report No. 1, Denver.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Public Health. *48*:844-853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, and W.B. Schaefer. 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.
4. U.S. Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

5. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Yolken (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder www.bd.com/ds.

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA

EC REP Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD