

**MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE**

**I EINFÜHRUNG**

Middlebrook- und Cohn-7H10-Agar ist ein Kulturmedium zur Kultivierung von Mykobakterien.

**II LEISTUNGSPRÜFUNG**

**A. Verfahren Zur Vorbereitung Der Inokula**

1. Löwenstein-Jensen-Schrägmedium mit Hilfe steriler Inokulationsstäbchen mit Stammkulturen der relevanten Mykobakterienstämme inokulieren.
2. Die Röhrchen mit gelösten Verschlüssen in einer mit Kohlendioxid angereicherten, aeroben Atmosphäre bei  $35 \pm 2$  °C inkubieren, bis starkes Wachstum auftritt (normalerweise nach 2 bis 3 Wochen).
3. Das Wachstum mit einem sterilen, angespitzten Applikatorstäbchen abnehmen; dazu vorsichtig die Zellen von der Mediumoberfläche ablösen und darauf achten, dass kein Kulturmedium mit den Zellen abgenommen wird.
  - a. Für *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
    - (1) Wachstum in 5,0 mL Middlebrook-7H9-Bouillon mit Glycerin in einem sterilen Glasröhrchen mit Schraubverschluss und sterilen Glasperlen übertragen.
    - (2) Mit dem Vortexmischer gründlich mischen (mehrere Minuten lang), bis die Suspension keine größeren Klümpchen mehr aufweist.
    - (3) Diese Suspension mit einem McFarland-Nephelometerstandard 1 vergleichen. Die Suspension sollte trüber sein als der Standard.
    - (4) Das Röhrchen in einen Röhrchenständer einsetzen und 2 bis 3 h lang bei Raumtemperatur stehen lassen, bis sich größere Partikel am Boden absetzen.
    - (5) Den Überstand in einen sterilen Behälter übertragen.
    - (6) Die Trübung der Suspension durch langsames Hinzufügen von steriler Middlebrook-7H9-Bouillon mit Glycerin auf einen McFarland-Standard von 1 einstellen. Gut schütteln.
    - (7) Vor der Verwendung auf  $10^5$  KBE/mL verdünnen. Gut mischen und das Testmedium mit Hilfe einer kalibrierten 0,01-mL-Impföse durch Ausstreichen inokulieren.
  - b. Für alle anderen mykobakteriellen Stämme:
    - (1) Wachstum in ein steriles 50-mL-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss übertragen, dem zuvor 8 bis 12 sterile Glasperlen (2 mm Durchmesser) und 5 mL folgendermaßen hergestelltes Mykobakterien-Verdünnungsmittel zugegeben wurden:
      - Folgende Bestandteile in einen 1-L-Behälter geben und den pH-Wert mit Hilfe von 1N Natriumhydroxid auf 6,7 bis 7,0 einstellen.

Rinderalbumin (fettsäurefrei) .....	1,0	g
Polysorbat 80 .....	0,1	mL
Dest. Wasser.....	500	mL
      - Durch Membranfiltrierung sterilisieren (0,2-µ-Filter)
      - Unter aseptischen Bedingungen in Mengen zu 5,5 mL in sterile Röhrchen mit Schraubverschlüssen geben.
    - (2) Mykobakterielles Wachstum an der Seitenwand eines Zentrifugenröhrchens mit Schraubverschluss mit Hilfe eines Applikatorstäbchens emulgieren. Den Wachstumsklumpen mit dem Verdünnungsmittel mischen.
    - (3) Das Röhrchen verschließen und ca. 10 Min lang im Vortexmischer mischen, bis das Wachstum gut suspendiert ist und keine größeren Klümpchen mehr aufweist.
    - (4) 15 mL steriles Mykobakterium-Verdünnungsmittel hinzufügen und gründlich mischen.
    - (5) Diese Suspension mit einem McFarland-Nephelometerstandard 1 vergleichen. Die Suspension sollte trüber sein als der Standard.
    - (6) Das Röhrchen in einen Röhrchenständer einsetzen und 2 bis 3 h lang bei Raumtemperatur stehen lassen, bis sich größere Partikel am Boden absetzen.
    - (7) Den Überstand aspirieren und in einen sterilen Behälter transferieren. Die Suspension sollte eine Trübung von mehr als McFarland 1 aufweisen und keine größeren Partikel enthalten. Enthält die Suspension immer noch größere Partikel, erneut mischen und 1 h lang stehen lassen. Den Überstand in einen sterilen Behälter transferieren.
    - (8) Die Trübung der Suspension durch langsames Hinzufügen von sterilem Mykobakterien-Verdünnungsmittel auf einen McFarland-Standard 1 einstellen. Gut schütteln.

- (9) Aliquote der Suspension in Gefrierfläschchen geben, die ein Etikett zur Organismus-Identifizierung und dem Vorbereitungsdatum aufweisen .
- (10) Die Suspensionen in einen Tiefemperaturregefrierschrank stellen und bei -60 °C einfrieren. Die Fläschchen können bis zu 6 Monate lang gelagert werden.
- (11) Zum Gebrauch das gefrorene Fläschchen aus dem Gefrierschrank entnehmen und den Inhalt schnell auftauen, indem das Fläschchen in ein Wasserbad mit 30–35 °C gegeben wird. Vor Gebrauch auf 10<sup>5</sup> KBE/mL verdünnen. Gut durchmischen und das Testmedium mit einer kalibrierten 0,01-mL-Impföse zur Inokulation ausstreichen.

#### B. Verfahren Für Testmedium

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
  - a. Die Agar-Oberflächen müssen vor der Inokulation frei von Feuchtigkeit sein.
  - b. Die Testbehälter mit Hilfe von sterilen, kalibrierten 0,01-mL-Einweg-Impfösen mit den wie oben beschrieben vorbereiteten Mykobakterienkulturen inokulieren.
  - c. Alle Behälter mit gelösten Verschlüssen in einer mit Kohlendioxid angereicherten, aeroben Atmosphäre bei 35 ± 2 °C inkubieren.
  - d. Röhren mit bereits vorher getestetem Middlebrook-7H10-Agar als Kontrollen mitführen.
2. Behälter nach 7, 14 und ggf. nach 21 Tagen auf Wachstum, Selektivität und Pigmentierung überprüfen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

Organismen	ATCC	Isolierung
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	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. Röhren oder Flaschen wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.
2. Die repräsentativen Röhren oder Flaschen auf sichtbare Beschädigungen prüfen, durch die ihre Verwendung beeinträchtigt werden könnte.
3. Nicht inokulierte repräsentative Röhren oder Flaschen bei 20 bis 25 °C und 30 bis 35 °C inkubieren und nach 7 Tagen auf mikrobielle Kontamination untersuchen.

### PRODUKTINFORMATIONEN

#### IV VERWENDUNGSZWECK

Middlebrook- und Cohn-7H10-Agar wird in qualitativen Verfahren zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien verwendet.

#### V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Im Verlauf der Zeit wurden viele verschiedene Kulturmedien zur Kultivierung von Mykobakterien verwendet. Die früheren Medien waren Zusammensetzungen auf Eibasis wie z.B. das Löwenstein-Jensen-Medium und das Petragnani-Medium. Dubos und Middlebrook trugen zur Entwicklung mehrerer Zusammensetzungen bei, die als Schlüsselbestandteile Ölsäure und Albumin enthielten, um das Wachstum der Tuberkelbazillen zu fördern und die Organismen gegen eine Reihe toxischer Stoffe zu schützen.<sup>1</sup> Middlebrook und Cohn verbesserten später die Zusammensetzung von Ölsäure-Albumin-Agar und konnten auf diesem Medium, 7H10, ein schnelleres und vermehrtes Wachstum der *Mykobakterien*-Spezies erzielen.<sup>2,3</sup> Berichten zufolge wachsen auf dem 7H10-Medium weniger Kontaminanten als auf allgemein für die Kultivierung von Mykobakterien eingesetzten Medien auf Eibasis.<sup>4</sup>

#### VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Middlebrook- und Cohn-7H10-Agar enthält eine Reihe von anorganischen Salzen, die für das Wachstum von Mykobakterien essentielle Substanzen liefern. Bei Umwandlung in Zitronensäure dient Natriumcitrat dazu, bestimmte anorganische Kationen in der Lösung zu halten. Glycerin ist eine reichhaltige Kohlenstoff- und Energiequelle. Ölsäure und andere langkettige Fettsäuren können von den Tuberkelbazillen aufgenommen werden und spielen eine wichtige Rolle im Mykobakterienstoffwechsel. Der primäre Effekt von Albumin besteht darin, dass es die Tuberkelbazillen gegen toxische Stoffe schützt und daher ihre Gewinnung bei der Erstisolierung erhöht. Katalase zerstört evtl. im Medium vorhandene toxische Peroxide. Teilweise Hemmung des Bakterienwachstums wird durch Malachitgrün erzielt.

## VII REAGENZIEN

### Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Ungefähre Zusammensetzung\* pro L destilliertem Wasser

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

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

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen: *In-vitro*-Diagnostikum.

Fest verschlossene Röhrchen und Flaschen sollten vorsichtig geöffnet werden, um Verletzungen durch Glasbruch zu vermeiden.

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. Vorbereitete Röhrchen, Probenbehälter und andere kontaminierte Materialien im Autoklav sterilisieren und erst dann entsorgen.

Beim Arbeiten mit klinischen Proben, bei denen kein Aerosol entsteht – 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. Bei der Vermehrung und der Arbeit mit Kulturen von *M. tuberculosis* und *M. bovis* sind Laborpraktiken und Verfahren sowie Sicherheitsvorrichtungen der Biosicherheitsstufe 3 erforderlich. Tierstudien erfordern ebenfalls besondere Maßnahmen.<sup>7</sup>

**Aufbewahrung:** Nach Erhalt Röhrchen und Flaschen im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Medien, die vor Gebrauch gemäß der Anleitung auf dem Etikett gelagert werden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

**Haltbarkeit des Produkts:** Röhrchen oder Flaschen bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

## VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Die Handhabung der für die Kultivierung geeigneten Proben kann auf verschiedene Arten geschehen. Detaillierte Informationen enthält die entsprechende Fachliteratur.<sup>9-11</sup> Die Proben sollten vor der Verabreichung von Antibiotika entnommen werden. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

## IX VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

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

**Testverfahren:** Aseptische Kautelen beachten.

Das beschriebene Testverfahren entspricht den Richtlinien der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) für die Erstisolierung von Mykobakterien enthaltenden Proben.<sup>9</sup>

N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid (NALC-NaOH)-Lösung wird als sanftes jedoch wirksames Aufschluss- und Dekontaminierungsmittel empfohlen. Diese Reagenzien sind im Lieferumfang des **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit enthalten. Detaillierte Anweisungen zur Dekontaminierung und Kultivierung sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.<sup>9-12</sup>

Die Behälter nach der Inokulation vor Licht schützen und in ein geeignetes System mit einer mit Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre einsetzen. Bei  $35 \pm 2$  °C inkubieren.

Schrägmedien und Medien in Flaschen sollten auf horizontaler Ebene inokuliert werden, bis das Inokulum absorbiert ist. Damit die für den Wachstumsbeginn erforderliche Kohlendioxidzirkulation gewährleistet wird, sollten die Verschlüsse der Röhrcchen und Flaschen in den ersten drei Wochen gelöst bleiben. Danach die Verschlusskappen schließen, um ein Austrocknen zu vermeiden und nur einmal pro Woche kurz öffnen. Um Platz zu sparen, können die Röhrcchen aufrecht stehend gelagert werden.

**HINWEIS:** Kulturen aus Hautläsionen mit Verdacht auf Anwesenheit von *M. marinum* oder *M. ulcerans* sollten für die Erstisolierung bei 25 bis 33 °C inkubiert werden; Kulturen mit Verdacht auf Anwesenheit von *M. avium* oder *M. xenopi* entwickeln bei 40 bis 42 °C ihr optimales Wachstum.<sup>9</sup> Eine Duplikatkultur bei 35 bis 37 °C inkubieren.

**Qualitätskontrolle durch den Anwender:** Siehe „Massnahmen zur Qualitätskontrolle“.

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder der Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie den Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Es wird empfohlen, die korrekten Qualitätskontrollverfahren den geltenden CLSI-Richtlinien und CLIA-Bestimmungen zu entnehmen.

## X ERGEBNISSE

Die Kulturen sollten innerhalb von 5 bis 7 Tagen nach der Inokulation und anschließend bis zu 8 Wochen lang einmal wöchentlich abgelesen werden.

Beobachtungen aufzeichnen:<sup>9</sup>

1. Anzahl der Tage bis zum makroskopischen Sichtbarwerden der Kolonien. Schnell wachsende Mykobakterien produzieren innerhalb von 7 Tagen reife Kolonien; langsam wachsende Mykobakterien benötigen für die Bildung reife Kolonien mehr als 7 Tage.
2. Anzahl der Kolonien (Flaschen):  
Keine Kolonien = Negativ  
Weniger als 50 Kolonien = Tatsächliche Anzahl  
50 bis 100 Kolonien = 1+  
100 bis 200 Kolonien = 2+  
Fast konfluierend (200 bis 500) = 3+  
Konfluierend (mehr als 500) = 4+
3. Pigmentbildung:  
Weiß, creme- oder lederfarben = nicht chromogen (NC)  
Zitronengelb, gelb, orange, rot = chromogen (Ch)  
Gefärbte Ausstriche können säurefeste Bazillen aufweisen, die nur als „säurefeste Bazillen“ aufgezeichnet werden, es sei denn, es werden genauere Bestimmungstests durchgeführt.  
Flaschen können durch Umdrehen in einem Präpariermikroskop untersucht werden. Bei 10 bis 60x mit Transmissionslicht ablesen. Bei 10 bis 20x einen Schnellscan zur Feststellung von Kolonien durchführen. Eine höhere Vergrößerung (30 bis 60x) ist zum Beobachten der Koloniemorphologie hilfreich, z.B. bei serpentinenförmigen Strichkolonien.

## XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Zur Identifizierung müssen die Mikroorganismen in Reinkultur vorliegen. Für die endgültige Identifizierung sollten morphologische, biochemische und/oder serologische Tests durchgeführt werden. Detaillierte Informationen und empfohlene Verfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.<sup>9-12</sup>

## XII LEISTUNGSMERKMALE

Vor der Freigabe werden alle Chargen von Middlebrook- und Cohn-7H10-Agar auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Mit einer kalibrierten 0,01-mL-Impföse werden repräsentative Proben der Charge mit auf  $10^5$  KBE/mL verdünnten Kulturen von *Mycobacterium kansasii* Gruppe I (ATCC 21478), *M. scrofulaceum* Gruppe II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Gruppe III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Gruppe IV (ATCC 6841) und *M. tuberculosis* (ATCC 25177) durch Ausstreichen inokuliert. Die Behälter werden nach der Inokulation mit gelösten Verschlüssen in einer mit 5 bis 10 % Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre bei  $35 \pm 2$  °C inkubiert. Die Behälter werden nach 7, 14 und 21 Tagen auf Wachstum und Pigmentierung überprüft. Innerhalb von 21 Tagen weisen alle Organismen mittleres bis starkes Wachstum auf. Pigmentierung der Kolonien: *M. kansasii* - weiß bis cremefarben-gelb; *M. scrofulaceum* – mittleres gelb bis orange; *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* und *M. fortuitum* - cremefarben.

### XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
220958	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, Packung mit 10 Röhrchen der Größe A
220959	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, Karton mit 100 Röhrchen der Größe A
297448	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, Packung mit 10 Röhrchen der Größe C
297396	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, Karton mit 100 Röhrchen der Größe C
297274	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, Karton mit 100 1-oz.-Flaschen (30 mL)

### 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, and W.B. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* 38:66-81.
4. Kubica, G.P., and W.E. Dye. 1967. Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology. PHS Publication No. 1547. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
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. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Cernoch, P.L., R.L. Enns, M.A. Saubolle, 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.
11. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
12. 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. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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



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.  
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD