



BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) und BBL MacConkey II Agar with MUG–I Plate



L009211 • Rev. 04 • August 2017

MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE

I EINFÜHRUNG

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (BD BBL Trypticase-Soja-Agar mit 5 % Schafblut) wird zur Kultivierung anspruchsvoller Organismen sowie zur Visualisierung von Hämolyseaktionen verwendet. **BD BBL MacConkey II Agar with MUG (MacConkey-II-Agar mit MUG)** dient zum präsumtiven Nachweis von *Escherichia coli*.

II TESTDURCHFÜHRUNG

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

- Repräsentative Proben mit Verdünnungen der nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
 - Mit einer volumetrischen Pipette oder einer vergleichbaren Methode 0,1 mL einer Verdünnung, die 30–300 KBE ergibt, auf jede Platte geben und zur Inokulation mit einem sterilen gläsernen Spatel ausstreichen.
 - Die *Staphylococcus*- und *Escherichia*-Stämme in einer aeroben Atmosphäre bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren. Die *Streptococcus*-Stämme in einer aeroben, mit Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren.
- Die Platten nach 18 bis 24 h auf Wachstum, Koloniegröße und Hämolyseaktionen untersuchen.
- Zu erwartende Ergebnisse

CLSI-Kontrollorganismen	ATCC-Stämme	Isolierung
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Wachstum, Beta-Hämolyse
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Wachstum, Alpha-Hämolyse
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Wachstum
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Wachstum

* Empfohlener Organismusstamm für die Qualitätssicherung durch den Anwender.

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

- Repräsentative Proben mit Verdünnungen der nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
 - Die Platten zur Isolierung mit 18 bis 24 h alten und im Verhältnis 1:10⁻¹ verdünnten Bouillonkulturen ausstreichen. Für *Proteus mirabilis* vor dem Ausstreichen zwei zusätzliche 10fache Verdünnungen anfertigen.
 - Die Platten bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in einer aeroben Atmosphäre inkubieren.
 - Für alle Organismen **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** (Agarplatten) als nichtselektive Kontrollen mittesten.
- Die Platten nach 18 bis 48 h auf Wachstum, Fluoreszenz, Pigmentierung und Selektivität untersuchen.
- Zu erwartende Ergebnisse

Organismen	ATCC	Isolierung	Koloniefarbe	Fluoreszenz
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Wachstum	Rosarote Kolonien	+
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Wachstum	Farblose Kolonien, Schwärmen gehemmt	–
* <i>Salmonella enterica</i> Subsp. <i>enterica</i> Serotyp Typhimurium	14028	Wachstum	Farblose Kolonien	–
* <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Hemmung (teilweise bis vollständig)	N/A	–

* Empfohlener Organismusstamm für die Qualitätssicherung durch den Anwender.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

- Die Platten wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben untersuchen.
- Die repräsentativen Platten im Hinblick auf Beschädigungen sichtbar prüfen, durch die ihre Verwendung beeinträchtigt werden könnte.
- Den pH-Wert potentiometrisch bei Raumtemperatur bestimmen. Er sollte innerhalb der Spezifikation liegen: $7,4 \pm 0,2$ (TSA II) bzw. $7,1 \pm 0,2$ (BD BBL MacConkey II Agar with MUG).
- Die Festigkeit der Platten während der Inokulation beachten.
- Unbeimpfte repräsentative Platten 72 h lang bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren und im Hinblick auf mikrobielle Kontamination untersuchen.

PRODUKTFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood wird zur Kultivierung anspruchsvoller Mikroorganismen und zur Visualisierung hämolytischer Reaktionen verwendet, welche viele Bakterienspezies zeigen.

BD BBL MacConkey II Agar with MUG dient zum präsumtiven Nachweis von *Escherichia coli*.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

BD BBL Trypticase Soy Agar ist auf Grund seiner Nährstoffzusammensetzung ein häufig verwendetes Medium, sowohl ohne Zusatz als auch als Basis für bluthaltige Medien. **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** wird häufig zur Gewinnung und Kultivierung anspruchsvoller Mikrobenspezies sowie zum Nachweis hämolytischer Reaktionen verwendet, die ein wichtiges Differenzierungsmerkmal für Bakterien, besonders für *Streptococcus*-Spezies, darstellen.

B. MacConkey II Agar with MUG

Die **BD BBL MacConkey II Agar**-Formulierung wurde 1983 veröffentlicht. Sie wurde speziell entwickelt, um die Hemmwirkung gegen das Schwärmen der *Proteus*-Spezies zu verbessern, um eine eindeutige Differenzierung zwischen Lactose fermentierenden Mikroorganismen und Lactose-Non-Fermenten zu ermöglichen sowie um hervorragendes Wachstum enterischer Pathogene zu fördern.

Trepeta und Edberg¹ modifizierten den MacConkey-Agar durch die Hinzufügung von MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid). Das resultierende Medium ermöglichte den Autoren innerhalb von 5 min den präsumtiven Nachweis von *E. coli* aus dem primären Plattenmedium.

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

Die Kombination von Casein und Sojapeptonen in der **BD Trypticase Soy Agar**-Basis verleiht dem Medium einen hohen Nährwert, da es organischen Stickstoff, insbesondere Aminosäuren und langkettige Peptide, liefert. Durch das Natriumchlorid wird das osmotische Gleichgewicht gewahrt.

Defibriniertes Schafblut ist das für die Anreicherung von Medien auf Agar-Basis am häufigsten verwendete Blut.² Die Hämolysereaktionen der Streptokokken sind klar definiert, und das Wachstum von *Haemophilus haemolyticus*, einem Apathogen, dessen hämolytische Kolonien von denen der beta-hämolytischen Streptokokken nicht zu unterscheiden sind, wird gehemmt.

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) ergibt ein hervorragendes Wachstum sowie Beta-Hämolyse bei *Streptococcus pyogenes* (Lancefield-Gruppe A); darüber hinaus ergibt es hervorragendes Wachstum und entsprechende Hämolysereaktionen bei anderen anspruchsvollen Organismen. Das Medium eignet sich zur Verwendung mit Bacitracin-Blättchen (**BD Taxo A**) von niedriger Konzentration (0,04 Einheiten) zur präsumtiven Identifizierung von Streptokokken der Gruppe A (*S. pyogenes*).

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

BD BBL MacConkey II Agar ist ein selektives Differenzierungsmedium. Es ist nur geringfügig selektiv, da die Konzentration an Gallensalzen, welche grampositive Mikroorganismen hemmen, im Vergleich mit anderen enterischen Plattenmedien niedrig ist. Kristallviolett ist ebenfalls im Medium enthalten, um das Wachstum grampositiver Bakterien, besonders von Enterokokken und Staphylokokken, zu hemmen.

Die Differenzierung enterischer Mikroorganismen wird durch die Kombination von Lactose und Neutralrot-Indikator erreicht. Farblose oder rosa bis rote Kolonien werden je nach Fähigkeit des Isolats, Kohlenhydrat zu fermentieren, gebildet.

Die meisten *E. coli*-Stämme (96–97 %) produzieren das Enzym β -D-Glucuronidase.³ Dieses Enzym hydrolysiert MUG unter Bildung von 4-Methylumbelliferon, einer Verbindung, die unter langwelligem UV-Licht (366 nm) fluoresziert. Die Aufnahme von MUG in die Formulierung lässt β -D-glucuronidase-positive *E. coli*-Stämme bei der Betrachtung unter UV-Licht blaugrün fluoreszieren.

VII REAGENZIEN

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

Pankreatisch abgebautes Casein.....	14,5 g	Agar.....	14,0 g
Papainisch abgebautes Sojamehl	5,0 g	Wachstumsfaktoren.....	1,5 g
Natriumchlorid	5,0 g	Defibriniertes Schafblut	5%

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

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

Pankreatisch abgebaute Gelatine	17,0 g	Natriumchlorid	5,0 g
Pankreatisch abgebautes Casein.....	1,5 g	Neutralrot.....	0,03 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	1,5 g	Kristallviolett	0,001 g
Lactose	10,0 g	MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid).....	0,1 g
Gallensalze.....	1,5 g	Agar.....	13,5 g

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

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Bei übermäßiger Feuchtigkeit das Unterteil der Platte nach oben drehen, versetzt auf den Deckel legen und an der Luft trocknen lassen, um zu verhindern, dass sich während der Inkubation Deckel und Unterteil aneinander festsaugen.

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“⁴⁻⁷ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Gebrauchsfertige Platten, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach der Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Die Agarplatten nach Erhalt bei 2–8 °C im Dunkeln aufbewahren. Einfrieren oder Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Gebrauchsfertige Platten, die bis unmittelbar vor der Verwendung bei 2–8 °C in der Originalverpackung aufbewahrt wurden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und für die empfohlene Inkubationsdauer inkubiert 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

Zur Kultivierung geeignete Proben können auf unterschiedliche Weise gehandhabt werden. Nähere Informationen entnehmen Sie bitte der entsprechenden Fachliteratur.^{8,9} Die Probenentnahme sollte vor der Verabreichung anderer antimikrobieller Mittel erfolgen. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) und **BD BBL MacConkey II Agar with MUG (BD I Plate)**

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren

Aseptisch vorgehen.

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

Die Probe nach dem Eintreffen im Labor so bald wie möglich ausstreichen. Die Ausstrichplatte dient primär zur Isolierung von Reinkulturen aus Proben mit Mischflora. Wenn das Material direkt von einem Abstrich kultiviert wird, alternativ den Abstrichtupfer über einen kleinen Oberflächenbereich am Rand rollen; dann von diesem inokulierten Bereich aus ausstreichen.

Die Platten vor Licht geschützt 18–24 h lang bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren. Atemwegsproben in einer aeroben Atmosphäre mit Kohlendioxid-Anreicherung inkubieren. Andere Proben aerob ohne Zusatz von CO_2 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

Nach der Inkubation weisen die meisten Platten einen Bereich mit konfluierendem Wachstum auf. Da es sich bei dem Ausstrichverfahren eigentlich um eine „Verdünnungstechnik“ handelt, wird in den Ausstrichbereichen eine stets abnehmende Anzahl von Mikroorganismen deponiert. Folglich sollte(n) einer oder mehrere dieser Bereiche isolierte Kolonien der in der Probe enthaltenen Organismen aufweisen. Außerdem kann das Wachstum jedes Organismus auf der Basis des Wachstums in jedem der ausgestrichenen Bereiche semiquantitativ bestimmt werden.

Typische Ergebnisse auf **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** sind die Folgenden:

1. Hämolytische Streptokokken können als durchsichtige oder undurchsichtige, als gräuliche, kleine (1 mm) oder große, matte und schleimhaltige (2–4 mm) Kolonien erscheinen, umringt von einer Hämolysezone. Es sollten Gramfärbungen angefertigt und untersucht werden, um die makroskopischen Ergebnisse zu überprüfen (andere Organismen, die Hämolyse verursachen können, sind u.a. *Listeria*, verschiedene Corynebakterien, hämolytische Staphylokokken, *Escherichia coli* und *Pseudomonas*). Bei der Berichterstattung kann sich die ungefähre quantitative Bestimmung der Anzahl von Kolonien hämolytischer Streptokokken als hilfreich für den Kliniker erweisen.
2. Pneumokokken erscheinen üblicherweise als sehr flache, glatte, durchsichtige, gräuliche und mitunter schleimhaltige Kolonien, die von einer schmalen Zone „grüner“ (Alpha-)Hämolyse umgeben sind.
3. Staphylokokken erscheinen als undurchsichtige, weiße bis goldgelbe Kolonien mit oder ohne Beta-Hämolysezon.
4. *Listeria*. Es werden kleine Beta-Hämolysezon gebildet. Diese lassen sich anhand ihrer Stäbchenform in den Färbungen unterscheiden sowie anhand ihrer Motilität bei Raumtemperatur.
5. Andere Organismen zeigen minimale Flora, und es ist zu erwarten, dass klinisch signifikante Isolate auch auf dieser nichtselektiven Formulierung wachsen.

Typische Koloniemorphologie auf **BD BBL MacConkey II Agar with MUG**:

Kolonien von Lactose fermentierenden Bakterien erscheinen rosa bis rosarot und können von einer Galle-Niederschlagszone umgeben sein, während Lactose-Non-Fermenter-Kolonien farblos sind. Das Medium unter langwelligem UV-Licht (366 nm) untersuchen. Für β -D-Glucuronidase positive Kolonien zeigen blaugrüne Fluoreszenz; für β -D-Glucuronidase negative Kolonien zeigen keine Fluoreszenz.

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Berichten zufolge ist das Wachstum von einigen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa* auf **BD BBL MacConkey Agar** gehemmt, wenn die Inkubation in einer mit CO_2 angereicherten Atmosphäre erfolgt.¹⁰

Nicht alle *E. coli*-Stämme fermentieren Lactose oder produzieren β -D-Glucuronidase. Einige Salmonellen- und Shigella-Stämme produzieren β -D-Glucuronidase und fluoreszieren.¹¹ Berichten zufolge fluoresziert ein geringer Prozentsatz an Yersinia und Streptokokken.¹²

Zur Identifizierung müssen die Organismen 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.^{8,9,13}

XII LEISTUNGSMERKMALE

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

BD BBL Trypticase Soy Agar (TSA) with 5% Sheep Blood wurde bei einer Studie unter Einsatz einer mit Bouillon angereicherten Kultur (Todd Hewitt) und der optischen Immunoassay-Methode zur Diagnose von Infektionen mit β -hämolytischen Streptokokken als Kontrolle verwendet. Es wurden fünfhundertundzwei (502) Proben getestet. TSA with 5% Sheep Blood zeigte eine Empfindlichkeit und Spezifität von 92,5 % bzw. 99,4 %.¹⁴ Nguyen et al. verwendeten **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** als „Goldstandard“ für den Nachweis von Streptokokken der Gruppe B im unteren Genitalbereich schwangerer Frauen.¹⁵ Bei einer anderen Studie konnten Rossmann et al. auf **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** erfolgreich *Lautropia mirabilis* aus den Mundhöhlen HIV-infizierter Kindern neu isolieren.¹⁶ Von den 85 Kindern, die in dieser Studie untersucht wurden, waren 35 (41,4 %) *L. mirabilis*-positiv. Isenberg et al. verwendeten **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** als Kontrolle zur Beurteilung der Isolierung von *Enterococcus* aus einem untersuchten selektiven Medium.¹⁷ Es wurden zweihundertundfünfzig (250) Streptokokkenstämme der Gruppe D aus klinischem Material und 8 Stämme des National Communicable Disease Center (Atlanta, USA) verwendet.

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Bei einer in einem Krankenhaus und in einem Universitätsklinikum durchgeführten klinischen Studie wurde MUG zu **BD BBL MacConkey II Agar** hinzugefügt, um β -Glucuronidase nachzuweisen. Es zeigte sich, dass die Dauer des Nachweises von *E. coli*-Stämmen von einer Stunde auf fünf Minuten reduziert werden konnte und dass die Fähigkeit, diese Organismen in Mischspezies nachzuweisen, verbessert war.¹

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr. Beschreibung

221949 **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** und **BD BBL MacConkey II Agar with MUG-BD I Plate**

XIV LITERATUR

1. Trepeta, R.W., and S.C. Edberg. 1984. Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 19:172-174.
2. Vera, H.D., and D.A. Power. 1980. Culture media, p. 969. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Truant (ed.), Manual of clinical microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Killian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B, 84:245-251.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO₂ vs. ambient incubation, abstr. C 179, p. 339. Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1979.
11. Feng, P.C.S., and P.A. Hartmen. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1320-1329.
12. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. Appl. Environ. Microbiol. 48:285-288.
13. 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.
14. Fries, S.M. 1995. Diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in a private clinic: comparative evaluation of an optical immunoassay method and culture. J. Pediatr. 126:933-936.
15. Nguyen, T.M., et al. 1998. Detection of group B streptococcus: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. J. Matern. Fetal. Med. 7:172-176.
16. Rossmann, S.N. et al. 1998. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. J. Clin. Microbiol. 36:1756-1760.
17. Isenberg, H.D., D. Goldberg, and J. Sampson, 1970. Laboratory studies with a selective medium. Appl. Microbiol. 20: 433-436.

Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung in Verbindung oder besuchen Sie 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.