

MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE

I EINFÜHRUNG

7H11-Agar ist ein Kulturmedium zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien.

II LEISTUNGSPRÜFUNG

A. Verfahren zur Herstellung von Inokula

1. Löwenstein-Jensen-Schrägmedium mithilfe von sterilen Inokulationsstäbchen mit Stammkulturen der entsprechenden mykobakteriellen Stämme inokulieren.
2. Die Röhrcchen mit locker aufgesetzten Kappen in einer aeroben Atmosphäre unter Zusatz von Kohlendioxid 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 *Mycobacterium 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 in ein Gestell geben und 2 bis 3 h lang bei Raumtemperatur stehen lassen, 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 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 zur Inokulation ausstreichen.
 - 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 Röhrchen 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-Mixer 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 in ein Gestell geben und 2 bis 3 h lang bei Raumtemperatur stehen lassen, 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 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 10⁵ KBE/mL verdünnen. Gut durchmischen und das Testmedium mit einer auf 0,01 mL kalibrierten Impfpfeife zur Inokulation ausstreichen.

B. Verfahren zum Testen des Mediums

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
 - a) Die Testbehälter mit einer sterilen, geeichten 0,01 mL-Einmal-Inokulationsöse mit den wie oben beschrieben präparierten Kulturen inokulieren.
 - b) Die Behälter mit locker aufgesetzten Kappen in einer aeroben Atmosphäre unter Zusatz von Kohlendioxid bei 35 ± 2 °C inkubieren.
 - c) Die Behälter des zuvor getesteten Middlebrook-7H10-Agars als Kontrollen verwenden.
2. Die Röhrchen oder Fläschchen nach 7, 14 und gegebenenfalls nach 21 Tagen auf Wachstum und Selektivität überprüfen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

Mikroorganismus	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 Stamm des Mikroorganismus zur Qualitätssicherung durch den Anwender.

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

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 inkubieren und nach 7 Tagen auf Kontamination durch Mikroorganismen überprüfen.

PRODUKTINFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

7H11-Agar wird in qualitativen Verfahren zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien verwendet.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Viele Kulturmedien wurden für die Kultivierung von Mykobakterien entwickelt. Die frühen Kulturmedien waren Rezepturen auf Eibasis, die Löwenstein-Jensen-Medium und Petragani-Medium enthielten. Dubos und Middlebrook entwickelten eine Vielzahl von Rezepturen, die Ölsäure und Albumin als Hauptbestandteile zur Wachstumsförderung von Tuberkelbazillen und zum Schutz der Bazillen gegen eine Vielzahl toxischer Wirkstoffe enthielten.¹ Im Folgenden verbesserten Middlebrook und Cohn die Formulierung des Ölsäure-Albumin-Agars und erreichten somit ein schnelleres und üppigeres Wachstum der *Mycobacterium*-Spezies auf ihrem Medium, dem so genannten 7H10.^{2,3}

Cohn et al. modifizierten die 7H10-Agar-Rezeptur durch den Zusatz von einem Gramm pankreatisch abgebautem Casein pro Liter, um somit das Wachstum der *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme zu verbessern, bei deren Beobachtung festgestellt wurde, dass sie nur schlecht (oder überhaupt nicht) auf 7H10 und anderen herkömmlichen Isolierungsmedien wachsen.⁴ Diese Rezeptur trägt die Bezeichnung 7H11-Agar.

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

7H11-Agar enthält eine Vielzahl anorganischer Salze, die essentielle Substanzen für das Wachstum von Mykobakterien liefern. Das Natriumcitrat hält bestimmte anorganische Kationen in der Lösung, wenn es in Zitronensäure umgewandelt wird. Glycerol ist eine reichhaltige Kohlenstoff- und Energiequelle. Das pankreatisch abgebaute Casein ist eine reiche Stickstoffquelle für das Wachstum von Tuberkelbazillen und liefert eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren.¹ Ölsäure und andere langkettige Fettsäuren können von Tuberkelbazillen verbraucht werden und spielen aus diesem Grund eine wichtige Rolle für den Metabolismus von Mykobakterien. Albumin wirkt primär als Schutz der Tuberkelbazillen gegen toxische Wirkstoffe und verbessert somit ihre Gewinnung bei der primären Isolierung. Die partielle Hemmung von Bakterien wird durch das Vorhandensein des Farbstoffes Malachitgrün erreicht.

VII REAGENZIEN

Seven H11 Agar

Ungefähre Zusammensetzung* pro 900 mL destilliertem Wasser

Pankreatisch abgebautes Casein	1,0	g
Magnesiumsulfat.....	0,05	g
Ammoniumeisen (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
Pyridoxin	1,0	mg
Zinksulfat	1,0	mg
Kupfersulfat	1,0	mg
Biotin	0,5	mg
Kalziumchlorid	0,5	mg
Malachitgrün	0,25	mg

Das vollständige Medium in präparierten Röhrchen enthält, zusätzlich zu den oben aufgeführten Bestandteilen, pro Liter 5 mL Glycerol und die Bestandteile der Middlebrook-OADC-Anreicherung, genauer gesagt:

Natriumchlorid	0,85	g
Dextrose	2,0	g
Rinderalbumin (Fraktion V)	5,0	g
Katalase	3,0	mg
Ölsäure	0,06	mL

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

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

Röhrchen mit fest sitzenden Verschlusskappen sind vorsichtig zu öffnen, um Verletzungen aufgrund von 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“⁴⁻⁸ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Präparierte Röhrchen, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

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.⁷

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.⁹⁻¹² Die Proben sollten vor der Verabreichung von Antibiotika entnommen werden. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Seven H11 Agar

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

Testverfahren: Antiseptische Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Die Testverfahren entsprechen den von den CDC (Centers for Disease Control and Prevention) empfohlenen Verfahren zur primären Isolierung von Proben, die Mykobakterien enthalten.⁹ N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid (NALC-NaOH)-Lösung wird als sanftes jedoch wirksames Aufschluss- und Dekontaminierungsmittel empfohlen. Diese Reagenzien sind im Aufschluss-/Dekontaminationskit für mykobakterielle Proben **BBL MycoPrep** enthalten. Nähere Informationen zur Dekontamination und Kultivierung sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.⁹⁻¹²

Die Röhrchen nach der Inokulation vor Licht schützen und in einem geeigneten System aufbewahren, das eine aerobe Atmosphäre, angereichert mit Kohlendioxid, bietet. Bei 35 ± 2 °C inkubieren.

Schrägagar-Medien sollten in waagerechter Lage inkubiert werden, bis das Inokulum absorbiert ist. Bei Röhrchen sollten die Verschlusskappen die ersten 3 Wochen locker aufgesetzt sein, 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. Bei Platzproblemen die Röhrchen aufrecht hinstellen.

HINWEIS: Kulturen aus Hautläsionen, von denen vermutet wird, dass sie *M. marinum* oder *M. ulcerans* enthalten, sollten zur primären Isolierung bei 25 – 33 °C inkubiert werden; Kulturen, von denen vermutet wird, dass sie *M. avium* oder *M. xenopi* enthalten, zeigen ihr optimales Wachstum bei 40 – 42 °C.⁹ Eine Kultur zur Doppelbestimmung bei 35 – 37 °C inkubieren.

Qualitätssicherung durch den Anwender: Siehe „Qualitätskontrollverfahren“.

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 Kulturen sollten innerhalb von 5 bis 7 Tagen nach der Inkubation und anschließend bis zu 8 Wochen wöchentlich überprüft werden.

Zu dokumentierende Beobachtungen⁹

1. Die Anzahl der Tage, die vergangen sind, bis die Kolonien makroskopisch sichtbar wurden. Schnell wachsende Mykobakterien bilden innerhalb von 7 Tagen reife Kolonien. Langsam wachsende Mykobakterien brauchen mehr als 7 Tage für die Bildung reifer Kolonieformen.
2. Pigmentbildung
Weiß, creme- oder lederfarben = nonchromogen (nc)
Zitronenfarben, gelb, orange, rot = chromogen (ch)
Gefärbte Abstriche können säurefeste Bazillen aufweisen, die jedoch erst dann als „säurefest“ interpretiert werden, wenn definitive Tests durchgeführt wurden.

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Zum Nachweis müssen die Organismen in Reinkultur vorhanden sein. Für die endgültige Identifizierung sollten morphologische, biochemische oder serologische Tests durchgeführt werden. Detaillierte Informationen und empfohlene Verfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.¹⁰⁻¹²

XII LEISTUNGSMERKMALE

Cohn et al. führten eine Studie durch, bei der 7H11-Agar mit 7H10-Agar verglichen wurde. Von 96 klinischen Isolaten der getesteten *M. tuberculosis*, wuchsen 13 in den ersten 3 Wochen nicht auf dem 7H10-Medium. 10 der 13 Kulturen wuchsen innerhalb von drei Wochen auf 7H11; die anderen drei benötigten weitere drei Wochen Inkubationszeit, ehe sie sichtbares Wachstum zeigten.⁴

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
221391	BD BBL Seven H11 Agar Slants, Packung mit 10 Röhrchen der Größe A
221392	BD BBL Seven H11 Agar Slants, Karton mit 100 Röhrchen der Größe A
296105	BD BBL Seven H11 Agar Slants, Packung mit 10 Röhrchen der Größe C
297704	BD BBL Seven H11 Agar Slants, Karton mit 100 Röhrchen der Größe C

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. Public 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. 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.K. 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.



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