

BD Middlebrook 7H10 Agar

VERWENDUNGSZWECK

BD Middlebrook 7H10 Agar (BD Middlebrook-7H10-Agar) wird zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien verwendet.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

In diesem Jahrhundert wurden viele Kulturmedien zur Kultivierung von Mykobakterien konzipiert. Die frühen Rezepturen hatten eine Eibasis und umfassten das Löwenstein-Jensen-Medium und das Petraghani-Medium. Dubos und Middlebrook waren federführend bei der Entwicklung einer Reihe von Rezepturen, welche Ölsäure und Albumin als Hauptbestandteile enthielten, um das Wachstum von Tuberkelbazillen zu unterstützen und die Organismen vor einer Vielzahl toxischer Agenzien zu schützen.¹ Anschliessend verbesserten Middlebrook und Crohn die Rezeptur von Ölsäure-Albumin-Agar und erhielten ein schnelleres, üppigeres Wachstum von *Mycobacterium*-Spezies auf ihrem als 7H10 bezeichneten Medium.^{2,3} Berichten zufolge wachsen auf dem 7H10-Medium tendenziell weniger Kontaminanten als auf den üblicherweise zur Kultivierung von Mycobakterien verwendeten Medien auf Eibasis.⁴

In **BD Middlebrook 7H10 Agar** liefern eine Vielzahl von anorganischen Salzen die für das Wachstum von Mykobakterien unerlässlichen Substanzen. In Zitronensäure umgewandelt, dient das Natriumcitrat dazu, bestimmte anorganischen Kationen gelöst zu halten. Glycerin ist eine reichhaltige Kohlenstoff- und Energiequelle. Ölsäure, wie auch andere langkettige Fettsäuren, kann von Tuberkelbazillen benötigt werden und spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus von Mykobakterien. Katalase zerstört die möglicherweise im Medium vorhandenen toxischen Peroxide. Die Primärwirkung von Albumin ist der Schutz der Tuberkelbazillen vor toxischen Agenzien. Deshalb verbessert es deren Isolierung bei der Erstisolierung. Die teilweise Hemmung von kontaminierenden Bakterien wird durch das Vorhandensein des malachitgrünen Farbstoffes erzielt.

REAGENZIEN

BD Middlebrook 7H10 Agar

Zusammensetzung* pro 1 Liter destilliertem Wasser

Magnesiumsulfat	0,025 g	Rinderalbumin V	5,0 g
Ammonium Eisen (III)-Citrat	0,04	Katalase	0,004
Natriumcitrat	0,4	Pyridoxin	0,001
Ammoniumsulfat	0,5	Zinksulfat	0,001
Mononatriumglutamat	0,5	Kupfersulfat	0,001
Dinatriumphosphat	1,5	Biotin	0,0005
Monokaliumphosphat	1,5	Calciumchlorid	0,0005
Agar	17,0	Malachitgrün	0,00025
Natriumchlorid	0,85	Glycerin	5,0
Glucose	2,0	Ölsäure	0,05 mL

pH 6,6 ± 0,2

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch. ⓧ

Agarplatten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

Hinweise zur aseptischen Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

Laborverfahren im Zusammenhang mit Mykobakterien benötigen spezielle Geräte und Methoden, um die Biogefährdung zu minimieren.⁵⁻⁷ Bei der Handhabung von Proben und Kulturen ist der Biosafety Level 3 einzuhalten.

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln bei 2 – 8 °C in der Originalverpackung lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Platten können bis zum Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.

Platten aus bereits geöffneten Stapeln mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Repräsentative Proben mit den nachfolgend aufgeführten Stämmen inokulieren (detaillierte Informationen siehe **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG**). Platten bei 35 ± 2 °C aerob oder in einer mit Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre inkubieren.

Stamm	Inkubieren	Ergebnis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	2 bis 3 Wochen	Gutes bis sehr gutes Wachstum
<i>Mycobacterium fortuitum</i> DSM 46621	2 bis 3 Wochen	Gutes bis sehr gutes Wachstum
<i>Mycobacterium smegmatis</i> DSM 43061	2 bis 5 Tage	Gutes bis sehr gutes Wachstum
<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755	2 bis 3 Wochen	Mittleres bis sehr gutes Wachstum
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2 bis 5 Tage	Gehemmtes Wachstum
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2 bis 5 Tage	Gehemmtes Wachstum
Nicht inokuliert	Bernsteinfarben, sehr leichte grünliche Schattierung	

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD Middlebrook 7H10 Agar (90 mm **Stacker**-Platten). Mikrobiologisch kontrolliert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten

Dieses Medium wird zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien aus klinischen Proben verwendet und kann ebenfalls für die Kultivierung von Mykobakterien in Spezialtests angewendet werden (z.B. zur Überprüfung von Desinfektionsmitteln gegen Mykobakterien). Siehe Literaturhinweise für weitere Details zu den geeigneten Proben.⁶⁻¹⁰

Testverfahren

Die Testverfahren sind die von CDC empfohlenen Methoden zur Erstisolierung aus Proben mit Mykobakterien. N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid (NALC-NaOH)-Lösung wird als sanftes, jedoch wirksames Aufschluss- und Dekontaminierungsmittel empfohlen. Detaillierte Anweisungen zur Dekontaminierung und zu den Kultivierungsverfahren sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen.⁴⁻¹⁰

Nach der Inokulierung Platten vor Licht schützen und sie mit dem Medium nach unten in ein mit einer **GasPak**-Einmal-CO₂-Generator-Hülle angetriebenes **BD GasPak**-Glas geben, oder in ein anderes geeignetes System zur Schaffung einer mit Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre. Bei 35 ± 2 °C inkubieren. Ein Austrocknen des Mediums während der Inkubation ist zu vermeiden.

Hinweis: Kulturen aus Haut- und Weichgewebewunden mit Verdacht auf *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*, *M. chelonae* oder anderen Spezies mit einem niedrigeren Temperaturoptimum müssen bei 25 – 33 °C inkubiert werden. Eine Duplikatkultur bei 35 – 37 °C inkubieren.^{5,9}

Ergebnisse

Die Platten können innerhalb von 5 – 7 Tagen nach der Inokulierung und danach einmal pro Woche bis zur 8. Woche abgelesen werden. Detaillierte Informationen zur Koloniemorphologie und Pigmentierung sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen.⁶⁻¹⁰

Zum Ablesen Platten auf dem Objektisch eines Präpariermikroskops umdrehen. Bei 10 – 60-facher Vergrößerung im Durchlicht ablesen. Platten bei 10 bis 20-facher Vergrößerung rasch auf das Vorhandensein von Kolonien überprüfen. Stärkere Vergrößerungsfaktoren (30 – 60x) sind zur Beobachtung der Koloniemorphologie hilfreich, d.h. rankenartige, schnurähnliche Kolonien.

Die folgenden Beobachtungen sind zu notieren:^{5,6}

1. Anzahl der benötigten Tage bis die Kolonien makroskopisch sichtbar werden.
2. Anzahl der Kolonien
 - Keine Kolonien = Negativ
 - Weniger als 50 Kolonien = Tatsächliche Anzahl notieren
 - 50 – 100 Kolonien = 1+
 - 100 – 200 Kolonien = 2+
 - Beinahe konfluierend (200 – 500) = 3+
 - Konfluierend (mehr als 500) = 4+
3. Pigmentbildung
 - Weiß, cremefarben oder gelbbraun = Nicht-chromogen (NC)
 - Zitronenfarben, gelb, orange, rot = Chromogen (Ch)

Gefärbte Ausstriche zeigen säurefeste Bazillen an, welche nur als "säurefeste Bazillen" notiert werden, es sei denn, dass definitive Tests durchgeführt werden. Informationen zu weiteren Differenzierungstests und Verfahren zur vollständigen Identifizierung der isolierten Organismen sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen.⁴⁻¹⁰

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD Middlebrook 7H10 Agar ist eines der Standard-Agar-Medien zur Isolierung und Kultivierung von Mykobakterien aus klinischen Proben.^{4,6,7-11}

Da dieses Medium nur teilweise selektiv ist, können außer Mykobakterien auch andere Bakterien wachsen, wenn die Proben nicht ordnungsgemäß zur Dekontaminierung vorbehandelt wurden.^{6,7,9,10}

Negative Kulturen schließen eine aktive Infektion mit Mykobakterien nicht aus. Zur guten Praxis sollten mehrere verschiedene Medienzusammensetzungen (fest und flüssig) inokuliert werden.⁶⁻¹⁰

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. 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. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
6. Sommers, H.M., and J.K. McClatchy. 1983. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., J.A. Morello. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Küchler, R., et al. 1998. Tuberkulose - Mycobacteriose. *In: Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gatermann (ed.). MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 5.* Urban & Fischer, Munich, Germany.
8. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
9. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium: general characteristics, isolation, and staining procedures.* *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H.*

- Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. DIN 58943. 1996. Diagnosis of tuberculosis. Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods. Beuth Verlag, Berlin.
11. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost, Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD Middlebrook 7H10 Agar

Best.-Nr. 254520 Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten
Best.-Nr. 254521 Gebrauchsfertige Plattenmedien, 120 Platten

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>
<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD