

Medizinische Mikrobiologie
Tuberkulosedagnostik
 Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium
 zur Anzüchtung von Tuberkulosebakterien

DIN
58 943
 Teil 7

Medical microbiology; diagnosis of tuberculosis; modified Löwenstein Jensen medium for the growth of tubercle bacilli

Inhalt

	Seite		Seite
1 Anwendungsbereich und Zweck	1	5 Qualitätsprüfung	2
2 Begriffe	1	5.1 Keimeinsaat	2
2.1 Kulturmedium	1	5.2 Beurteilung der biologischen Eigenschaften	2
2.2 Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium	1	6 Kennzeichnung	3
3 Bezeichnung	1	6.1 Kennzeichnung direkt auf dem Kulturröhrchen	3
4 Anforderungen	1	6.2 Kennzeichnung auf der Außenverpackung	3
4.1 Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen, Emulsion und Eimasse	1	Zitierte Normen und andere Unterlagen	3
4.2 Herstellung des Kulturmediums	2	Erläuterungen	3
4.3 Biologische Eigenschaften des Kulturmediums	2		

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für eine Modifikation des Kulturmediums nach Löwenstein-Jensen, das zur Anzüchtung von Tuberkulosebakterien aus klinischem Untersuchungsgut dient.

Zweck dieser Norm ist es, die biologischen Mindestanforderungen an das Kulturmedium durch Definition seiner Zusammensetzung, Herstellung und Qualitätsprüfung festzulegen. Das Kulturmedium nach dieser Norm gilt als Standardkulturmedium, mit dem alle anderen für die Tuberkulosedagnostik erforderlichen Kulturmedien verglichen werden können.

2 Begriffe

2.1 Kulturmedium

Die Begriffe der verschiedenen Kulturmedien für die Bakteriologie sind in DIN 58 942 Teil 1 definiert.

2.2 Modifiziertes Löwenstein-Jensen-Kulturmedium

Das modifizierte Löwenstein-Jensen-Kulturmedium ist ein festes Kulturmedium zur Anzüchtung von Tuberkulosebakterien aus Untersuchungsgut.

3 Bezeichnung

Bezeichnung eines modifizierten Löwenstein-Jensen-Kulturmediums zum Nachweis von Tuberkulosebakterien (LJ):
 Kulturmedium DIN 58 943 – LJ

4 Anforderungen

4.1 Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen, Emulsion und Eimasse

4.1.1 Salzlösung

Zusammensetzung:

Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei
 (M = 136,09 g/mol) nach Ph. Eur. I ¹⁾

2,4 g

¹⁾ Nach Ph. Eur. I: Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch) Band I

²⁾ Über die Bezugsquelle gibt Auskunft:
 Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Postfach 11 07, 1000 Berlin 30

Magnesiumsulfat · 7-hydrat (M = 246,47 g/mol) nach Ph. Eur. I ¹⁾	0,24 g
tri-Magnesiumdicitrat · 14-hydrat (M = 703,33 g/mol) nach Ph. Eur. I ¹⁾	0,6 g
L-Asparagin Monohydrat reinst (M = 150,14 g/mol)	3,6 g
Glycerin 84 % bis 87 % V/V (M = 92,10 g/mol) nach Ph. Eur. I ¹⁾	12,0 ml
destilliertes Wasser	600,0 ml

Herstellung:

Die festen Substanzen werden in 400 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Zusatz des Glycerins wird mit destilliertem Wasser auf 600 ml aufgefüllt.

4.1.2 Malachitgrünlösung ²⁾

Zusammensetzung:

Malachitgrün	2 g
destilliertes Wasser	ad 100 ml

Herstellung:

Das Malachitgrün wird in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung kann lichtgeschützt bei Umgebungstemperatur von 12 bis 28 °C vorrätig gehalten werden und muß vor Gebrauch filtriert werden, um ausgefallene Kristalle zu entfernen.

4.1.3 Kartoffelmehlemulsion

Zusammensetzung:

Salzlösung nach Abschnitt 4.1.1	600,0 ml
Malachitgrünlösung nach Abschnitt 4.1.2	20,0 ml
Kartoffelmehl	30,0 g

Herstellung:

Zu 200 ml der Salzlösung werden 20 ml Malachitgrünlösung zugegeben, 30 g Kartoffelmehl zugesetzt und durch Rühren gleichmäßig verteilt. Der Rest der Salzlösung (400 ml) wird aufgekocht und der Kartoffelmehlemulsion hinzugefügt. Unter weiterer Erwärmung wird so lange gerührt, bis die Emulsion völlig homogen ist. Die fertige Emulsion wird 30 min bei 112 °C im Sterilisator sterilisiert.

Fortsetzung Seite 2 und 3

4.1.4 Eimasse

Zusammensetzung:

1000 ml Eimasse aus 20 bis 25 frischen Eiern (nicht älter als 1 Woche; das Gewicht der einzelnen Eier soll 40 g nicht unterschreiten, damit das richtige Verhältnis zwischen Eigelb und Eiweiß sichergestellt ist).

Herstellung:

Die Eier werden mechanisch gereinigt, in 70 % Ethanol (vergällt) getaucht und nach dem Herausnehmen abgeflammt. Danach werden sie aufgeschlagen, in ein steriles Gefäß entleert und homogenisiert.

4.2 Herstellung des Kulturmediums

1000 ml Eimasse nach Abschnitt 4.1.4 werden mit 620 ml Kartoffelmehlemulsion nach Abschnitt 4.1.3 gemischt. Schaumbildung ist zu vermeiden.

4.3 Biologische Eigenschaften des Kulturmediums

4.3.1 Sterilität

Das Kulturmedium muß keimfrei sein, d. h., das unbeimpfte Kulturmedium darf nach einer Bebrütung bei 22 bis 28 °C und $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 8 Wochen kein makroskopisches Wachstum von Mikroorganismen zeigen.

4.3.2 Nachweis des charakteristischen Wachstums

Das Kulturmedium muß – bei Beimpfung bis zum Verfalldatum – das Wachstum subkultivierbarer Kolonien von *Mycobacterium tuberculosis* entsprechend Abschnitt 5.2 sicherstellen.

5 Qualitätsprüfung

Zur Qualitätsprüfung des Kulturmediums sind 6 Kulturröhrchen jeder Charge mit Suspensionen vom Teststamm *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv zu beimpfen.

5.1 Keimeinsaat

5.1.1 Teststamm

Als Teststamm ist eine Kultur von *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv in der Phase des aktiven Wachstums zu verwenden.

Zur besseren Beurteilung der Morphologie wachsender Kolonien ist die Beimpfung mit Suspensionen definierter Keimdichte nach den Abschnitten 5.1.2 und 5.1.3 erforderlich.

5.1.2 Bakteriensuspension

5.1.2.1 Zusammensetzung und Herstellung

Die Bakteriensuspension, von der für die Beimpfung der Kulturmedien ausgegangen wird, muß etwa 1 mg Bakterienfeuchtgewicht/ml (etwa eine gehäufte Öse, innerer Durchmesser 3 mm) enthalten.

Die Dichte der Suspension wird durch visuellen Vergleich mit einer Referenzsuspension nach Abschnitt 5.1.3 eingestellt.

Als Suspensionsmedium dient 0,9 %ige NaCl-Lösung mit 0,1 % Tween 80 nach Ph. Eur. I ¹⁾.

Die Bakterienmasse wird in ein Röhrchen DIN 58 970 – 24 × 100 – G 1 übertragen und zunächst trocken an der Glaswand mit einem rundgeschmolzenen Glasstab oder in einem Glashomogenisator verrieben. Es ist darauf zu achten, daß möglichst kein Kulturmediummaterial in die Suspension gebracht wird, da sonst ein höherer Bakteriengehalt vorgetäuscht wird.

Durch tropfenweise Zugabe von Suspensionsmedium wird unter ständigem Verreiben eine möglichst homogene Suspension hergestellt. Die Homogenisation kann auch mit Hilfe von Glasperlen erfolgen.

Diese Bakteriensuspension wird etwa 10 min stehengelassen; während dieser Zeit sedimentieren gröbere Bakterienagglomerate. Der Überstand wird mit einer Pipette in ein anderes Röhrchen übertragen.

Durch weitere Zugabe von Suspensionsmedium wird die Bakteriensuspension auf eine Trübung eingestellt, die derjenigen der Referenzsuspension nach Abschnitt 5.1.3 entspricht.

5.1.2.2 Verdünnungsstufen

Von der nach Abschnitt 5.1.2.1 hergestellten Bakteriensuspension wird eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 im Suspensionsmedium bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} hergestellt.

Für die Beimpfung werden die Verdünnung 10^{-2} (Suspension 1), 10^{-3} (Suspension 2), 10^{-4} (Suspension 3), 10^{-5} (Suspension 4) und 10^{-6} (Suspension 5) als Einsaatgrößen benötigt. Dies entspricht dem 2., 3., 4. bzw. 5. und 6. Röhrchen der Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10.

5.1.3 Referenzsuspension

Zur Herstellung der Referenzsuspension sind Bariumsulfat nach Abschnitt 5.1.3.1 oder Latexpartikel nach Abschnitt 5.1.3.2 geeignet.

5.1.3.1 Bariumsulfatsuspension

Zu etwa 5 ml einer *m*/20-Bariumchlorid-Lösung wird *m*/10 Schwefelsäure tropfenweise zugegeben, bis die Trübung des so entstandenen Bariumsulfats bei 1 cm Schichtdicke und einer Wellenlänge von 546 nm bei Messung gegen Wasser eine Transmission von 40 bis 45 % (entsprechend einer Extinktion von 0,35 bis 0,4) ergibt. Diese Suspension muß vor jeder Messung und später vor jedem Vergleich mit den Bakteriensuspensionen aufgeschüttelt werden.

Für den Vergleich zwischen Bakteriensuspension und Referenzsuspension müssen gleichartige Röhrchen verwendet werden.

5.1.3.2 Latexsuspension

1 ml Latexsuspension (Latex, Partikelgröße $0,481 \mu\text{m} \pm 0,0016 \mu\text{m}$) ²⁾ wird in 300 ml destilliertes Wasser suspendiert. Diese Suspension wird photometrisch, wie für Bariumsulfat nach Abschnitt 5.1.3.1 beschrieben, eingestellt. Nach Zugabe eines Thymolkristalls ist sie für mindestens 6 Monate haltbar.

5.1.4 Beimpfung

Zur Beimpfung wird mit einer Pipette oder einer Öse ein Tropfen Suspension auf das Kulturmedium aufgetragen.

Es ist darauf zu achten, daß das Inokulum gleichmäßig auf der Oberfläche des Kulturmediums verteilt wird.

Der Verschluß der Röhrchen muß einen Gasaustausch sicherstellen, aber eine Austrocknung verhindern. Bewährt haben sich neben durchbohrten Stopfen [1] vor allem aber Kappenverschlüsse, denen aus Sicherheitsgründen der Vorzug zu geben ist.

5.1.5 Bebrütung

Die Bebrütungstemperatur beträgt $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Die Dauer der Bebrütung soll 4 Wochen betragen.

5.2 Beurteilung der biologischen Eigenschaften

Die Anforderungen an das modifizierte Löwenstein-Jensen-Kulturmedium sind erfüllt, wenn Einzelkolonien von *Mycobacterium tuberculosis* Stamm H₃₇Rv nach 4wöchiger Inkubation bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ und 60 bis 80 % relativer Luftfeuchtigkeit hinsichtlich ihres charakteristischen Wachstums der Abbildung entsprechend aussehen.

¹⁾ Siehe Seite 1

²⁾ Siehe Seite 1