

## **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)**

### **VERWENDUNGSZWECK**

**BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate) (BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar mit 5 % Schafblut (Doppelplatte))** ist ein verbessertes Medium und wird zur selektiven Isolierung von gramnegativen und grampositiven Bakterien aus klinischen Proben verwendet.

### **GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS**

Mikrobiologische Methode.

MacConkey Agar ist eine der frühesten Rezepturen (veröffentlicht von MacConkey im Jahr 1900) zur Isolierung, Kultivierung und Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und bestimmten nicht-fermentierenden Mikroorganismen. Später wurde dieses Medium mehrmals modifiziert.<sup>1,2</sup>

Die MacConkey II Agar-Rezeptur wurde im Jahr 1987 konzipiert, um die Hemmung von schwärmenden *Proteus*-Spezies zu verbessern und damit eine endgültigere Differenzierung von Lactose-fermentierenden und nicht-Lactose-fermentierenden Bakterien und ein überlegenes Wachstum von enterischen Bakterien zu erreichen. In MacConkey II Agar liefern Peptone die Nährstoffe. Kristallviolett wird beigefügt, um grampositive Bakterien, besonders Enterokokken und Staphylokokken, zu hemmen. Die Differenzierung von enterischen Mikroorganismen wird durch die Kombination von Lactose und Neutralrot als pH-Indikator erreicht. Farblose oder rosa bis rote Kolonien werden je nach Fähigkeit des Isolats, Kohlenhydrat zu fermentieren, gebildet.<sup>3-5</sup>

Ellner et al. berichteten 1966 über die Entwicklung einer neuen Blutagar-Zusammensetzung, die als Columbia Agar bezeichnet wurde.<sup>6</sup> Dieses Medium, das größere Kolonien und ein ausgeprägteres Wachstum erzielt als vergleichbare Blutagar-Medien, wird für Kulturmedien, die Blut enthalten, und für selektive Zusammensetzungen verwendet. Ellner et al. entdeckten, dass ein Medium mit 10 mg Colistin und 15 mg Nalidixinsäure je Liter in Columbia Agar-Basis, angereichert mit 5 % Schafblut, das Wachstum von Staphylokokken, hämolytischen Streptokokken und Enterokokken unterstützt und gleichzeitig das Wachstum von *Proteus*-, *Klebsiella*- und *Pseudomonas*-Spezies hemmt.<sup>6</sup> Im Laufe der Jahre haben Bakterien eine höhere Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen entwickelt. Dies gilt insbesondere für gramnegative Stäbchen, die gehemmt werden sollten, aber auf Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood häufig Wachstum zeigen. In Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood wurde eine kleine Menge Aztreonam zugegeben, um die hohe Selektivität dieses Mediums zu erhalten, und die Konzentration der Nalidixinsäure auf 5,5 mg/L reduziert, um die Isolierung von grampositiven Kokken, insbesondere Staphylokokken, zu verbessern. Die Konzentration von Colistin blieb unverändert. Aztreonam ist ein Monobactam, das nur gegen die meisten gramnegativen Bakterien wirkt, während grampositive Organismen nicht betroffen sind.<sup>7-9</sup>

Das Schafblut ermöglicht den Nachweis von hämolytischen Reaktionen, die insbesondere für die Verdachtsdiagnose von Streptokokken von Bedeutung sind.<sup>10</sup>

Der Hauptvorteil von Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood gegenüber Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood ist das verbesserte Wachstum von Staphylokokken, die bereits nach 18 bis 24 Stunden Inkubationszeit entdeckt werden, und die verbesserte Hemmung von resistenten gramnegativen Bakterien, insbesondere *Proteus* spp.

Die Kombination dieser beiden Medien auf einer Doppelplatte (**BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood**) wird zur selektiven Isolierung von gramnegativen und grampositiven Bakterien aus klinischen Proben verwendet.

## REAGENZIEN

### BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)

Zusammensetzungen\* pro L destilliertem Wasser

MacConkey II Agar		Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood	
Pankreatisch abgebaute Gelatine	17,0 g	Peptone	20,0 g
Pankreatisch abgebautes Casein	1,5	Hefeextrakt	3,5
Peptisch abgebautes Tiergewebe	1,5	Tryptisch abgebautes Rinderherz	3,0
Lactose	10,0	Maisstärke	1,0
Gallensalze	1,5	Natriumchlorid	5,0
Natriumchlorid	5,0	Colistin	10,0 mg
Neutralrot	0,03	Nalidixinsäure	5,5
Kristallviolett	0,001	Aztreonam	3,0
Agar	13,5	Schafblut, defibriniert	5 %
pH 7,1 ± 0,2		pH 7,3 ± 0,2	

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

## SICHERHEITSHINWEISE

**IVD** . Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal. Ⓢ

Platten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissbildung oder bei sonstigen Anzeichen einer Qualitätsverschlechterung nicht verwenden.

Hinweise zu Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des gebrauchten Produkts sind den **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNGEN** zu entnehmen.

## LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln in der Originalverpackung bei 2 – 8 °C 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 Packungen 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 GEBRAUCHSANLEITUNGEN**). Platten 18 – 24 h bei 35 – 37 °C bevorzugt in umgedrehter Position aerob inkubieren.

Stämme	MacConkey II Agar	Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gutes bis sehr gutes Wachstum; pinkfarbene bis rote Kolonien mit Galle-Präzipitaten	Vollständig gehemmtes Wachstum
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Gutes bis sehr gutes Wachstum; beigefarbene bis bräunliche Kolonien, gehemmtes Schwärmen	Vollständig gehemmtes Wachstum
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Teilweise (bis vollständig) gehemmtes Wachstum	Gutes bis sehr gutes Wachstum; kleine graue Kolonien
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Vollständig gehemmtes Wachstum	Weißer bis gelbliche Kolonien mit Beta-Hämolyse
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Nicht getestet	Kleine gräuliche Kolonien; Beta- Hämolyse
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Nicht getestet	Kleine grüne bis graue Kolonien; Alpha-Hämolyse
Nicht inokuliert	Hellrosa, leicht opaleszierend	Rot, opak

## VERFAHREN

### Mitgelieferte Materialien

**BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood** (90-mm-Stacker-Doppelplatten). Mikrobiologisch kontrolliert.

### Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

### Probenarten

Die Medien auf dieser Doppelplatte werden zur selektiven Isolierung von vielen gramnegativen und grampositiven Bakterien aus allen klinischen Probenarten verwendet (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**).

### Testverfahren

Die Probe nach dem Eintreffen im Labor so bald wie möglich ausstreichen. Die Ausstrichplatte dient primär zur Isolierung von Reinkulturen aus Proben mit Mischflora.

Um diese Doppelplatte mit Proben von Tupfern zu inokulieren, zuerst den Tupfer über einen kleinen Bereich Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood abrollen und danach über einen kleinen Bereich MacConkey II Agar. Die inokulierten Bereiche mit einer frischen Öse pro Material zur Isolierung ausstreichen. Platten 24 bis 48 h bei 35 – 37 °C in Umgebungsluft inkubieren. Die Inkubation dieses Produkts in einer mit Kohlenstoff angereicherten aeroben Atmosphäre wird nicht empfohlen, da sich Ergebnisse auf MacConkey Agar möglicherweise von durch Inkubation in Umgebungsluft erzielten Ergebnissen unterscheiden.<sup>11</sup>

Da es grampositive und gramnegative Organismen gibt, welche auf beiden Medien dieser Doppelplatte gehemmt werden oder nicht in der Umgebungsluft wachsen, wird empfohlen, eine nicht selektive Blut-Agar-Platte, z. B. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** mit einzubeziehen und sie 24 bis 48 h bei 35 – 37 °C in einer mit Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre aerob zu inkubieren.

### Ergebnisse

Das typische Wachstum auf **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood (Biplate)** hat das folgende Erscheinungsbild:

Organismen	MacConkey II Agar	Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood
<i>E. coli</i>	Rosafarben bis rosenrot (u. U. umgeben von einer Zone von Galle-Präzipitaten)	Teilweise (bis vollständig) gehemmtes Wachstum
<i>Enterobacter</i>	Mucoid, rosafarben	Teilweise (bis vollständig) gehemmtes Wachstum
<i>Klebsiella</i>	Mucoid, rosafarben	Teilweise (bis vollständig) gehemmtes Wachstum
<i>Proteus</i>	Farblos, gehemmtes Schwärmen	Teilweise (bis vollständig) gehemmtes Wachstum; gehemmtes Schwärmen
<i>Salmonella</i>	Farblos	Vollständig gehemmtes Wachstum
<i>Shigella</i>	Farblos	Vollständig gehemmtes Wachstum
<i>Pseudomonas</i>	Unregelmäßig, farblos bis rosafarben	Teilweise (bis vollständig) gehemmtes Wachstum
Staphylokokken	Teilweise bis vollständig gehemmtes Wachstum	Wachstum; weiße bis gelbe, kleine bis mittelgroße Kolonien, mit oder ohne Beta-Hämolyse.
Streptococci	Vollständig gehemmtes Wachstum	Wachstum; winzige bis mittelgroße Kolonien mit oder ohne Beta-Hämolyse
Enterokokken	Teilweise bis vollständig gehemmtes Wachstum	Wachstum; winzige bis mittelgroße Kolonien; möglicherweise mit gräulichen Rändern, gewöhnlich nicht hämolytisch

Weitere, nicht in der Tabelle aufgeführte gramnegative und grampositive Bakterien können auf diesen Medien ebenfalls ein Wachstum aufweisen. Detaillierte Informationen hierzu und zur Interpretation des Wachstums enthält die entsprechende Literatur.<sup>4,10,12</sup>

## LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

**BD MacConkey II Agar** ist eines der Standardmedien für das Anlegen primärer Plattenkulturen von klinischen Proben und verschiedenen nicht klinischen Materialien. Auf diesem Medium wachsen Organismen der *Enterobacteriaceae*-Familie sowie eine Vielzahl anderer gramnegativer Stäbchen, z. B. *Pseudomonas* und verwandte Genera. Nicht fermentierende Bakterien oder andere für die selektiven Bestandteile empfängliche gramnegative Stäbchen wachsen nicht auf diesem Medium. Bevor das Medium für spezifische Organismen verwendet wird, sollten die jeweiligen Literaturhinweise konsultiert werden.<sup>4,10,12</sup>

**BD Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood** ist ein verbessertes selektives Medium zur Isolierung und Kultivierung von zahlreichen aerob wachsenden grampositiven Mikroorganismen, z. B. Streptokokken, Staphylokokken, *Listeria* spp, und andere aus klinischen Proben. Das Medium ermöglicht den schnelleren Nachweis von Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken sowie eine bessere Hemmung von gramnegativen Bakterien als Columbia CNA Agar mit 5% Sheep Blood.

In internen Leistungsevaluierungen wurden 38 Stämme (klinische Isolate und Sammelstämme) grampositiver Bakterien der in Tabelle 1 beschriebenen Spezies und viele gramnegative Bakterien mit **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate) auf Wachstum getestet. BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (= COL)** wurde als Wachstums-Referenzmedium verwendet. Die Platten wurden 18 bis 24 h bei 35 - 37 °C aerob inkubiert.

Quinolonresistente *Proteus*-Stämme wurden auf Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood vollständig gehemmt, zeigten aber auf MacConkey II Agar und Columbia Agar starkes Wachstum.

Die Koloniegrößen und Hämolysezonen auf Columbia CNA Improved II with 5% Sheep Blood waren mit denen auf Columbia Agar vergleichbar. Mit Ausnahme von *Corynebacterium diphtheriae* zeigten alle grampositiven Stämme auf Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood innerhalb einer aeroben Inkubation von 18 - 20 Stunden Wachstum und wurden auf MacConkey II Agar vollständig gehemmt. Für *C. diphtheriae* waren 42 Inkubationsstunden für Nachweis erforderlich. Die Tests wurden mit Staphylokokken, die eine Inkubationszeit von 2 Tagen benötigten, auf normalem CNA Agar durchgeführt.

**Tabelle 1:** Auf BD Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (aerobe Inkubation) getestete und isolierte grampositive Spezies

<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Streptococcus</i> der Gruppe C
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	<i>Streptokokken</i> der Gruppe G
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	

\* 48 Inkubationsstunden erforderlich für Nachweis auf **CNA-II** und **CNA**.

Verfahrensbeschränkungen: Gramnegative Bakterien, die eine Resistenz gegen die selektiven Bestandteile aufweisen, können ebenfalls ein Wachstum auf diesem Medium aufweisen. Das Wachstum von *Candida*-Spezies und anderen Pilzen wird auf diesem Medium nicht gehemmt.

Obwohl es sich hierbei um grampositive Bakterien handelt, wird das Wachstum aerober Sporenbildner wie beispielsweise *Bacillus* spp auf Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood unter Umständen gehemmt.

*Corynebacteria* benötigt möglicherweise 42 bis 48 Stunden Inkubationszeit auf Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood.

Bestimmte Streptokokken, z. B. *Streptococcus intermedius* und *Streptococcus milleri* benötigen zum eine mit CO<sub>2</sub> angereicherte oder anaerobe Atmosphäre für Wachstum. Die Columbia Agar-Basis weist einen relativ hohen Kohlenhydratanteil auf. Dadurch können beta-hämolytische Streptokokken eine grünliche hämolytische Reaktion hervorrufen, die auf Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood, Improved II fälschlicherweise als alpha-Hämolyse interpretiert werden kann.

Obwohl eine Vielzahl gramnegativer und grampositiver Bakterien auf einer der Medien dieser Doppelplatte, d. h. **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)**, Wachstum aufweisen kann, wird die Verwendung eines nicht selektiven Mediums zur Erstisolierung aller möglicherweise in der Probe vorhandenen Pathogene empfohlen.<sup>10</sup> **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** ist ein häufig verwendetes, nicht selektives, primäres Plattenmedium, welches zu diesem Zweck benutzt werden kann. Zur Isolierung von anspruchsvollen Organismen, wie z. B. *Neisseria* oder *Haemophilus*, sollte ebenfalls eine Schokoladen-Agar-Platte, z. B. **BD Chocolate Agar (GC II Agar with IsoVitalex)** mit der Probe inokuliert werden, wenn ein Verdacht auf diese Organismen besteht.

Es wurde berichtet, dass einige *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa* auf MacConkey Agar gehemmt werden, wenn sie in einer mit CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre inkubiert werden.<sup>11</sup> Aus diesem Grund darf **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)** nicht in einer mit CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre inkubiert werden.

Bei einigen Platten mit starkem Staphylokokken-Wachstum auf dem Medium Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood, Improved II und keinem Wachstum auf dem Medium MacConkey II Agar wurde auf dem Medium MacConkey II Agar ein Verblässen der Farbe festgestellt, Dies hat keine negative Auswirkung auf die Isolierung und typische Koloniefärbung gramnegativer Bakterien auf MacConkey II Agar.

Obwohl bestimmte diagnostische Tests direkt auf diesen Medien durchgeführt werden können, sind für eine vollständige Identifizierung der Isolate biochemische und, falls indiziert, immunologische Tests unter Verwendung von Reinkulturen erforderlich.

## LITERATUR

1. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
2. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
3. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
4. Farmer, J.J., III., K.D. Boatwright, and J.M. Janda 2007. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M.L. Landry, J.H. Jorgensen, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9<sup>th</sup>ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Downes, F.P., and K. Ito. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4<sup>th</sup> edition. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.
6. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. Am. J. Clin. Pathol. 45: 502-504.
7. Wood, W., G. Harvey, E.S. Olson, and T.M. Reid. 1993. Aztreonam selective agar for Gram positive bacteria. J. Clin. Pathol. 46: 769-771.
8. Wiedemann, B., and B. A. Atkinson. 1986. Susceptibility to antibiotics: species incidence and trends. In: Lorian, V. (ed.), Antibiotics in Laboratory medicine, p. 962-1208. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
9. von Graevenitz, A. 1986. Use of antimicrobial agents as tools in epidemiology, identification, and selection of microorganisms. In: Lorian, V. (ed.), Antibiotics in Laboratory medicine, p. 723-738. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
10. Spellerberg, B., Brandt, C. 2007. *Streptococcus*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M.L. Landry, J.H. Jorgensen, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9<sup>th</sup>ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

11. Mazura-Reetz, G. T. Neblett, and J. M. Galperin. 1979. MacConkey Agar: CO<sub>2</sub> vs. ambient incubation. Abst. Ann. Mtg. American Society for Microbiology. C179.
12. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

## VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

### BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)

Best.- Nr.	Beschreibung
<input type="checkbox"/> REF 257574	Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten
<input type="checkbox"/> REF 257584	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 ist eine Marke der American Type Culture Collection.

BD, das BD-Logo und Stacker sind Marken von Becton, Dickinson and Company.

© 2015 Becton, Dickinson and Company