

# BBL™ Prepared Tubed Media for Differentiation of *Mycobacterium paratuberculosis*

Herrold's Egg Yolk Agar Slants with Mycobactin J and ANV  
Herrold's Egg Yolk Agar Slants (w/o Mycobactin J) with ANV

8817831  
2004/08

English: pages 1 – 2      Italiano: pagine 5 – 6  
Français : pages 2 – 3      Español: páginas 6 – 7  
Deutsch: Seiten 3 – 5

## INTENDED USE

Herrold's Egg Yolk Agars are used for the selective isolation and differentiation of *Mycobacterium paratuberculosis*. Mycobacteria other than *M. paratuberculosis* will grow on Herrold's Egg Yolk Agar (w/o Mycobactin), while *M. paratuberculosis* will not grow unless the growth factor, Mycobactin, is provided.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Paratuberculosis (Johne's disease) is a chronic granulomatous enteritis of ruminants first described in 1826.<sup>1</sup> Johne and Frothingham further described the disease in 1895 and demonstrated the presence of acid-fast bacilli in affected intestine.<sup>1</sup> The first successful isolation of this organism occurred in 1910.<sup>2</sup> Early nutritional studies demonstrated the stimulatory effect of an ethanol soluble substance obtained from other mycobacteria (e.g., *M. phlei*) called "mycobactin."<sup>3</sup> The organism fails to grow on the medium lacking the growth factor.

Cultivation of *M. paratuberculosis* from fecal specimens is the most frequently used method to diagnose paratuberculosis. Specific procedures are described elsewhere for the cultivation of *M. paratuberculosis* from bovine fecal specimens.<sup>4-7</sup>

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Enzymatic digest of casein provides amino acids and other nitrogenous substances. Beef extract provides additional nitrogenous nutrients, vitamins and minerals required for microbial growth. Sodium chloride maintains osmotic equilibrium. Sodium pyruvate is a source of energy for bacterial metabolism. Egg yolk and glycerol provide fatty acids and other nutrients required for the metabolism of mycobacteria.

Most mycobacteria produce endogenous siderophores (iron binding compounds) called mycobactin and will grow on Herrold's Egg Yolk Agar whether or not mycobactin has been added. *M. paratuberculosis* is unable to grow on media lacking mycobactin. Mycobactin J permits earlier and more abundant growth of *M. paratuberculosis* than other mycobactins.<sup>8,9</sup>

Amphotericin B enhances the selectivity of the medium by inhibiting contaminating fungi. Nalidixic acid inhibits contaminating gram-negative organisms and vancomycin inhibits contaminating gram-positive organisms. Malachite green is included to help control contaminants and enhance the visibility of colonies.

## REAGENTS

### Formulae:

Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and ANV

Approximate Formula\*

Pancreatic Digest of Casein	9.0	g
Beef Extract	2.7	g
Sodium Chloride	4.0	g
Sodium Pyruvate	4.1	g
Malachite Green	0.1	g
Amphotericin B	0.05	g
Mycobactin J	0.002	g
Agar	15.3	g
Nalidixic Acid	0.05	g
Vancomycin	0.05	g
Egg Yolks	100.0	mL
Glycerol	27.0	mL
Purified Water	873.0	mL

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Herrold's Egg Yolk Agar (without Mycobactin J) with ANV contains the same ingredients except that Mycobactin J is omitted.

### Warnings and Precautions:

For Veterinary Use.

Tubes with tight caps should be opened carefully to avoid injury due to breakage of glass.

**Storage Instructions:** On receipt, store media in the dark at 2 – 8°C. Avoid freezing and overheating. Do not open until ready to use. Minimize exposure to light. Media stored as labelled until just prior to use may be inoculated up to the expiration date and incubated for up to 16 weeks.

After storage in the upright position, tubes of egg media may appear to have a large amount of water at the bottom of the slants. The fluid will be reabsorbed into the medium if the tubes are placed on their sides so that the fluid covers the surface of the slant.

Allow the medium to warm to room temperature before inoculation.

**Product Deterioration:** Do not use medium if it shows evidence of microbial contamination, discoloration, drying or other signs of deterioration.

## SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Refer to appropriate texts for details of specimen collection and handling procedures.<sup>10</sup>

Observe established precautions against microbiological hazards throughout all procedures. All specimens should be handled according to CDC-NIH recommendations, NCCLS guidelines or local institution guidelines for any potentially infectious materials. Prior to discarding, sterilize specimen containers and other contaminated materials by autoclaving.

## PROCEDURE

**Material Provided:** Depending upon which product is ordered, one of the prepared media listed below (see "AVAILABILITY") is provided.

**Materials Required But Not Provided:** Ancillary culture media, reagents, quality control organisms and laboratory equipment are required for this procedure.

**Test Procedure:** Observe aseptic techniques.

1. Weigh out 1 – 2 g of fecal sample.
2. Process specimen using a recommended procedure<sup>4-7</sup> to remove or kill contaminating organisms other than mycobacteria.
3. Inoculate tubes of Herrold's Egg Yolk Agar with and without Mycobactin J with no more than 0.25 mL (5 – 7 drops from a sterile transfer pipette) of the final processed and decontaminated material.
4. Incubate tubes at 35 – 37°C in a slanted position with the caps loose.
5. Tighten caps when medium surface is dry (1 – 2 weeks) and place in an upright position in the incubator.
6. Read and evaluate tubes for growth and contamination every week for up to 16 weeks.

### User Quality Control:

1. Examine medium for signs of deterioration as described under "Product Deterioration."
2. Check performance by inoculating a representative sample of medium with 0.1 mL of a 1:100 dilution of a No. 1 McFarland suspension in water of pure cultures of stable control organisms that produce known, desired reactions. The following test strains are recommended.

Medium	Test Strain	Expected Results
Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC™ 19698	Growth within 6 weeks
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Growth within 3 weeks
Herrold's Egg Yolk Agar (without Mycobactin J) with ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	No growth in 6 weeks
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Growth within 3 weeks

## RESULTS

Colonies appearing should be evaluated for typical acid-fastness and morphological appearance of *M. paratuberculosis*. *M. paratuberculosis*-like colonies should not appear on the medium lacking Mycobactin J.

To confirm Mycobactin J dependency, suspend suspect colonies in 0.5 mL autoclaved distilled or deionized water so that the turbidity is equivalent to a No. 1.0 McFarland nephelometer standard. Dilute the suspension 100-fold in autoclaved distilled or deionized water. Inoculate 0.1 mL of the suspension onto a single tube of Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and 0.1 mL onto a single tube of the medium without Mycobactin J. Incubate tubes for 1 week with loosened caps at 35 – 37°C. Tighten caps and reincubate. Examine tubes weekly for the presence of growth. Acid-fast cultures that grow only in the presence of Mycobactin J are identified as *M. paratuberculosis*.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Results for individual laboratories may differ depending on specimen storage conditions, the time between collection and receipt in the laboratory, the efficiency of decontamination procedures, the types and amount of spore-forming organisms in the sample, frequency of reading cultures, organism distribution within the inoculum and other conditions which may vary from laboratory to laboratory.

Subcultures of *M. paratuberculosis* may occasionally lose their dependency on Mycobactin. Reduced growth of the organism may be observed after multiple transfers.

A single medium is rarely adequate for detecting all organisms of potential significance in a specimen. The agents in selective media may inhibit some strains of the desired species or permit growth of a species they were designed to inhibit, especially if the species is present in large numbers in the specimen. Specimens cultured on selective media should, therefore, also be cultured on nonselective media to obtain additional information and help ensure recovery of potential pathogens.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS<sup>11</sup>

Cultures were performed in two different laboratories: a state-supported veterinary diagnostic lab (Lab A) and a veterinary school-based research lab (Lab B). Each laboratory processed fecal samples from 25 different animals that were known to be culture positive for *M. paratuberculosis*. Specimens represented animals characterized as high (>50 CFU/slant), moderate (10 – 50), and low (<10) shedders. Samples were removed from storage at –70°C, thawed rapidly, and processed using the double decontamination method as described by Whitlock.<sup>5</sup> Approximately six drops of processed sediment were inoculated onto each Herrold's Egg Yolk Agar (HEYA) slant (with and without added mycobactin). Each lab prepared their own Herrold's Egg Yolk Agar according to the same formulation<sup>1</sup> using different sources of raw materials.

In Lab A, a single tube of BBL HEYA and one tube each from four different lots of lab-prepared HEYA were inoculated using a portion of the same decontaminated specimen. Tubes were observed biweekly, beginning on week 2, for a total of 12 weeks. *M. paratuberculosis* was recovered on all five media for 16 of the specimens. Of the nine remaining cultures, growth was recovered on all nine BBL HEYA slants while one

or more tubes of lab-prepared media did not grow the organism. Growth was evident by week 4 on seven BBL HEYA slants. After 6 weeks of incubation, *M. paratuberculosis* was recovered on the remaining BBL HEYA media and on 15 of the lab-prepared lots. The remaining cultures on lab-prepared media were positive in 8 – 12 weeks.

In Lab B, duplicate tubes of a single lot of BBL HEYA and four different lots of lab-prepared HEYA were inoculated. Cultures were observed weekly for 14 weeks. No growth was observed on any medium for four samples. Two cultures from low shedders were recovered on lab-prepared media and not on BBL HEYA: one on all four lab-prepared lots of media, and one on two of four lab-prepared lots. Similarly, two cultures recovered on BBL HEYA were only recovered on two of four lots of lab-prepared media. This variation in recovery was attributable to the low numbers of organisms in the inoculum (no more than two colonies on any slant). One specimen that was recovered on all lots of lab-prepared media was overgrown with contaminating organisms before growth of *M. paratuberculosis* was detected. Of the remaining 15 cultures, 8 were positive one or more weeks earlier on BBL HEYA than on any lab-prepared lot. Four were positive on BBL HEYA and one lot of lab-prepared medium, while the other lab-prepared media were delayed a week or more. Three cultures were recovered a week earlier on lab-prepared media than on BBL HEYA.

The results of these studies indicate that recovery of *M. paratuberculosis* on BBL HEYA is substantially equivalent to freshly prepared lab media of similar formulation. These results suggest that some cultures may be detectable a week or more earlier on BBL HEYA.

#### AVAILABILITY

Cat. No.	Description
222232	BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slants with Mycobactin J and ANV, Pkg. of 10 size C tubes.
222233	BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slants with Mycobactin J and ANV, Ctn. of 100 size C tubes.
222240	BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slants (without Mycobactin J) with ANV, Pkg. of 10 size C tubes.
222241	BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slants (without Mycobactin J) with ANV, Ctn. of 100 size C tubes.
245158	BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar Slants with Mycobactin J and ANV, Pkg. of 10 Mycoflask™.

#### REFERENCES

- Chiodini, R.J., H.J. van Kruijning, and R.S. Merkal. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74: 218-262.
- Twort, F.W. 1910. A method for isolating and growing the lepra bacillus of man (preliminary note). *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 83: 156-158.
- Twort, F.W., and G.L.Y. Ingram. 1912. A method for isolating and cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 84: 517-542.
- Whipple, D.L., D.R. Callihan, and J.L. Jarnagin. 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 368-373.
- Whitlock, R.H., A.E. Rosenberger, and P.A. Spencer. 1989. Laboratory culture techniques for Johne's disease: a critical evaluation of contamination and incubation times. *Proc. Annu. Meet. U.S. Animal Health Assn.* 93: 382-386.
- Whitlock, R.H. and R.W. Sweeney. 1990. Johne's disease: current aspects of transmission and the art of fecal culture. *Proc. Annu. Meet. Livestock Conservation Inst.*, p. 24-30.
- Stabel, J.R. 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 375-380.
- Merkal, R.S., and W.G. McCullough. 1982. A new mycobactin, mycobactin J from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 7: 333-335.
- Thoen, C.O., and K.H. Baum. 1988. Current knowledge of paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1609-1611.
- U.S. Department of Agriculture. 1985. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology. National Veterinary Services Laboratories, Animal and Plant Health Inspection Service, Ames, Iowa.
- Data on file, BD Diagnostics.

## Tubes de milieu BBL prêts à l'emploi pour la différenciation de *Mycobacterium paratuberculosis*

Géloses inclinées de Herrold au jaune d'œuf avec de la mycobactine J et ANV  
Géloses inclinées de Herrold au jaune d'œuf (sans mycobactine J) avec ANV

Français

#### APPLICATION

Les géloses de Herrold au jaune d'œuf servent à l'isolement sélectif et la différenciation sélective de *Mycobacterium paratuberculosis*. Les mycobactéries autres que *M. paratuberculosis* développent sur les géloses de Herrold au jaune d'œuf (sans mycobactine) tandis que *M. paratuberculosis* ne se développera pas tant que leur facteur de croissance, la mycobactine, n'est pas fournie.

#### RESUME ET EXPLICATION

La paratuberculose (la maladie de Johne) est une entérite granulomateuse chronique des ruminants qui a été décrite pour la première fois en 1826.<sup>1</sup> Johne et Frothingham ont approfondi la description de la maladie en 1895 et ont mis en évidence la présence de bacilles acido-résistants dans l'intestin touché.<sup>1</sup> Le premier isolement réussi de cet organisme date de 1910.<sup>2</sup> Des études nutritionnelles préliminaires ont mis en évidence l'effet stimulateur d'une substance soluble dans l'éthanol extraite des autres mycobactéries (soit *M. phlei*) appelée "mycobactine".<sup>3</sup> L'organisme ne se développe pas sur un milieu ne contenant pas le facteur de croissance.

La culture de *M. paratuberculosis* provenant d'échantillons fécaux est la méthode la plus fréquemment utilisée pour diagnostiquer la paratuberculose. Des méthodes spécifiques pour la culture de *M. paratuberculosis* à partir d'échantillons fécaux bovins sont décrites ailleurs.<sup>4-7</sup>

#### PRINCIPES DE LA METHODE

Un hydrolysate enzymatique de caséine fournit des acides aminés et d'autres substances azotées. Un extrait de viande de boeuf fournit des nutriments azotés supplémentaires, et des vitamines et des minéraux requis par la croissance microbienne. Le chlorure de sodium assure l'équilibre osmotique du milieu. Le pyruvate de sodium est une source d'énergie pour le métabolisme bactérien. Le jaune d'œuf et le glycérol fournissent les acides gras et les autres nutriments nécessaires au métabolisme des mycobactéries.

La plupart des mycobactéries produisent des sidérophores endogènes (composés se liant au fer) appelés mycobactine, qui se développent sur les géloses de Herrold au jaune d'œuf avec ou sans l'ajout de la mycobactine. *M. paratuberculosis* ne se développera pas sur le milieu dépourvu de mycobactine. La mycobactine J assure une croissance précoce et plus abondante de *M. paratuberculosis* que les autres mycobactines.<sup>8,9</sup>

L'amphotéricine B améliore la sélectivité du milieu en inhibant les champignons contaminants. L'acide nalidixique inhibe les organismes contaminants à Gram négatif tandis que la vancomycine inhibe les organismes contaminants à Gram positif. Le vert malachite est ajouté pour aider à contrôler les contaminants et améliorer la visibilité des colonies.

#### REACTIFS

##### Formules :

Gélose de Herrold au jaune d'œuf avec de la mycobactine J et ANV  
Formule approximative\*

Digestion pancréatique de caséine	9,0	g
Extrait de viande de boeuf	2,7	g
Chlorure de sodium	4,0	g
Pyruvate de sodium	4,1	g
Vert malachite	0,1	g
Amphotéricine B	0,05	g
Mycobactine J	0,002	g
Gélose	15,3	g
Acide nalidixique	0,05	g
Vancomycine	0,05	g
Jaune d'œuf	100,0	mL
Glycérol	27,0	mL
Eau purifiée	873,0	mL

\*Ajustée et/ou supplémentée en fonction des critères de performance imposés.

La gélose de Herrold au jaune d'œuf (sans mycobactine J) avec ANV contient les mêmes ingrédients à l'exception de la mycobactine J qui est omise.

##### Avertissements et précautions :

pour les laboratoires vétérinaires.

Les tubes à capuchons serrés doivent être ouverts avec précaution pour éviter les blessures dues au bris de verre.

**Instructions de conservation :** dès réception, conserver les milieux à l'obscurité à 2 – 8 °C. Eviter la congélation et la surchauffe. Ne les ouvrir qu'au moment de leur utilisation. Minimiser l'exposition à la lumière. Les milieux conservés comme indiqué sur l'étiquette jusque juste avant l'emploi peuvent être inoculés jusqu'à la date de péremption et incubés pendant un total de 16 semaines.

Après la conservation dans la position verticale, les tubes de milieu à l'œuf peuvent sembler présenter une large quantité d'eau en bas des plans inclinés. Le liquide sera réabsorbé dans le milieu si les tubes sont couchés de façon que ce liquide recouvre toute la surface du plan incliné.

Laisser le milieu se réchauffer à température ambiante avant l'inoculation.

**Détérioration du produit :** ne pas utiliser le milieu s'il présente des signes de contamination, décoloration, coloration ou tout autre signe de détérioration.

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Consulter les références appropriées pour le détail des procédures de prélèvement et de préparation des échantillons.<sup>10</sup>

Observer à tout moment les techniques et précautions en vigueur en matière de protection contre les dangers microbiologiques. Tous les échantillons doivent être manipulés en suivant les recommandations du CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health), les directives du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) ou des institutions locales pour tout matériel potentiellement infectieux. Avant de les jeter, stériliser à l'autoclave tous les récipients ayant contenu des échantillons et tout le matériel contaminé.

## METHODE

**Matériel fourni** : en fonction du produit commandé, l'un des milieux prêts à l'emploi décrits ci-dessous (cf. MATERIEL DISPONIBLE) est fourni.

**Matériel requis mais non-fourni** : milieux de culture, réactifs, organismes de contrôle de la qualité et matériel de laboratoire requis par cette procédure.

**Mode opératoire du test** : utiliser des méthodes aseptiques.

1. Peser 1 – 2 g d'échantillon fécal.
2. Préparer l'échantillon conformément à une procédure approuvée<sup>4-7</sup> afin d'éliminer ou de tuer tous les organismes contaminants autres que les mycobactéries.
3. Inoculer des tubes de gélose de Herrold au jaune d'oeuf avec ou sans mycobactine J avec au plus 0,25 mL (5 – 7 gouttes d'une pipette de transfert stérile) du matériau complètement préparé et décontaminé.
4. Incuber les tubes à 35 – 37 °C dans la position inclinée, les capuchons étant desserrés de façon à permettre à la surface du milieu de sécher.
5. Serrer les capuchons dans les 1 – 2 semaines qui suivent et placer les tubes dans l'incubateur en position verticale.
6. Lire et évaluer les tubes en termes de croissance et de contamination toutes les semaines pendant au plus 16 semaines.

**Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur** :

1. Inspecter le milieu à la recherche de signes de détérioration comme décrit dans "Détérioration du produit".
2. Vérifier la performance en inoculant un échantillon représentatif du milieu avec 0,1 mL d'une dilution au 1:100 d'une suspension aqueuse équivalente à un McFarland No 1 de cultures pures d'un d'organismes de contrôle stable produisant des réactions connues et souhaitées. Les souches de contrôle suivantes sont recommandées.

Milieu	Souche de Contrôle	Resultats Escomptes
Agar de Herrold au jaune d'oeuf avec de la mycobactine J et ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Croissance en 6 semaines
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Croissance en 3 semaines
Agar de Herrold au jaune d'oeuf (sans mycobactine J) avec ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Pas de croissance au bout de 6 semaines
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Croissance en 3 semaines

## RESULTATS

Il faut vérifier que les colonies qui se développent présentent l'acido-résistance et l'aspect morphologique caractéristiques de *M. paratuberculosis*. Des colonies du genre *M. paratuberculosis* ne doivent pas se développer sur le milieu dépourvu de mycobactine J.

Pour confirmer la dépendance vis-à-vis de la mycobactine J, suspendre des colonies suspectes dans 0,5 mL d'eau distillée ou déionisée stérilisée à l'autoclave de façon que la turbidité soit équivalente au standard néphélométrique de McFarland 1,0. Diluer la suspension 100 fois dans de l'eau distillée ou déionisée stérilisée à l'autoclave. Inoculer 0,1 mL de la suspension dans un seul tube de gélose de Herrold au jaune d'oeuf avec de la mycobactine J et 0,1 mL dans un seul tube du milieu sans mycobactine J. Incuber les tubes pendant 1 semaine avec les capuchons desserrés à 35 – 37 °C. Serrer les capuchons et réincuber. Examiner les tubes chaque semaine pour observer la croissance. Les cultures acido-résistantes qui ne poussent qu'en présence de mycobactine J sont identifiées comme étant *M. paratuberculosis*.

## LIMITES DE LA METHODE

Les résultats de laboratoires individuels peuvent être différents de ceux de ces deux études en raison des conditions de conservation des échantillons, du temps écoulé entre le prélèvement et la réception au laboratoire, de l'efficacité des méthodes de décontamination, des types et de l'abondance des organismes producteurs de spores présents dans l'échantillon, de la fréquence des lectures des cultures, de la distribution de l'organisme au sein de l'inoculum et d'autres conditions pouvant varier d'un laboratoire à l'autre.

Les repiquages de *M. paratuberculosis* peuvent à l'occasion perdre leur dépendance vis-à-vis de la mycobactine. Une croissance réduite de cet organismes peut être observée après des repiquages multiples.

Un seul milieu ne suffit en général pas pour mettre en évidence tous les organismes potentiellement significatifs présents dans un échantillon. Les agents dans les

milieux sélectifs peuvent inhiber certaines souches des espèces désirées et permettre la croissance d'une espèce qu'ils avaient pour objet d'inhiber, surtout si cette espèce est présente en grand nombre dans l'échantillon. Les échantillons en culture sur des milieux sélectifs doivent par conséquent aussi être cultivés sur des milieux non sélectifs pour obtenir des informations complémentaires et assurer l'isolement de tous les pathogènes potentiels.

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE<sup>11</sup>

Les cultures ont été effectuées dans deux laboratoires différents : un laboratoire de diagnostic vétérinaire financé par un état (Lab A) et un laboratoire de recherches dans une école vétérinaire (Lab B). Chaque laboratoire a préparé des échantillons fécaux à partir de 25 animaux différents connus pour donner des cultures positives de *M. paratuberculosis*. Les échantillons représentaient des animaux correspondants à des excréteurs élevés (>50 UFC/gélose inclinée), modérés (10 – 50) et faibles (<10). Les échantillons ont été sortis du congélateur à -70 °C puis rapidement décongelés et préparés au moyen de la méthode de décontamination double décrite par Whitlock.<sup>5</sup> Environ six gouttes du sédiment préparé ont été inoculées sur chaque gélose inclinée de Herrold au jaune d'oeuf (HEYA). Chaque laboratoire a préparé ses propres géloses de Herrold au jaune d'oeuf suivant la même formule<sup>1</sup> en utilisant des matériaux bruts d'origines différentes.

Au Lab A, un seul tube de HEYA BBL et un tube pour chacun de quatre lots différents de HEYA BBL préparé par le laboratoire ont été inoculés à partir du même échantillon décontaminé. Les tubes ont été examinés toutes les deux semaines en commençant par la semaine 2 sur un total de 12 semaines. *M. paratuberculosis* a été isolé sur les cinq milieux à partir de 16 des échantillons. Pour les neuf échantillons restants, une croissance a été observée sur chacune des neuf géloses inclinées HEYA BBL alors que un ou plus des tubes de milieux préparés par le laboratoire ne présentait pas de croissance de l'organisme. La croissance était évidente à la semaine 4 sur sept des géloses inclinées HEYA BBL. Après 6 semaines d'incubation, *M. paratuberculosis* a été isolé sur les milieux HEYA BBL restants et sur 15 des lots préparés par le laboratoire. Les cultures restantes sur les milieux préparés par le laboratoire sont apparues positives au bout de 8 – 12 semaines.

Au Lab B, deux exemplaires de tubes d'un lot unique de HEYA BBL et de quatre lots de HEYA BBL préparés par le laboratoire ont été inoculés. Les cultures ont été observées toutes les semaines pendant 14 semaines. Aucune croissance n'a été observée sur aucun milieu pour quatre échantillons. Deux cultures ont été isolées à partir d'échantillons d'excréteurs sur des milieux préparés par le laboratoire et pas sur le milieu HEYA BBL, dont une sur chacun des quatre lots de milieux préparés par le laboratoire et l'autre sur deux des quatre lots préparés par le laboratoire. De même, deux cultures isolées sur HEYA BBL ont seulement été obtenues sur deux des quatre lots de milieux préparés par le laboratoire. Cette variation dans les résultats est attribuable au faible nombre d'organismes dans les inoculums (pas plus de 2 colonies sur chaque gélose inclinée). Un échantillon positif sur tous les lots de milieux préparés par le laboratoire a été envahi par les organismes contaminants avant que la croissance de *M. paratuberculosis* ne puisse être décelée. Des 15 cultures restantes, 8 étaient positives une semaine ou plus, plus tôt sur HEYA BBL que sur l'un quelconque des lots préparés par le laboratoire. Quatre étaient positives sur HEYA BBL et sur un lot de milieu préparé par le laboratoire tandis que sur les autres lots préparés par le laboratoire la réponse positive était retardée d'une semaine ou plus. Trois cultures ont été isolées sur les milieux préparés par le laboratoire une semaine plus tôt que sur HEYA BBL.

Les résultats de ces études indiquent que l'isolement de *M. paratuberculosis* sur HEYA BBL équivaut celui obtenu sur des milieux fraîchement préparés par le laboratoire de formule similaire. Ces résultats suggèrent que certaines cultures peuvent être mises en évidence une semaine plus tôt ou plus sur HEYA BBL.

## MATERIEL DISPONIBLE

N° cat.	Description
222232	Géloses inclinées de Herrold BBL au jaune d'oeuf avec de la mycobactine J et ANV, coffret de 10 tubes de taille C.
222233	Géloses inclinées de Herrold BBL au jaune d'oeuf avec de la mycobactine J et ANV, boîte de 100 tubes de taille C.
222240	Géloses inclinées de Herrold BBL au jaune d'oeuf (sans mycobactine J) avec ANV, coffret de 10 tubes de taille C.
222241	Géloses inclinées de Herrold BBL au jaune d'oeuf (sans mycobactine J) avec ANV, boîte de 100 tubes de taille C.
245158	Géloses inclinées de Herrold BBL au jaune d'oeuf avec de la mycobactine J et ANV, coffret de 10 tubes Mycoflask.

**BIBLIOGRAPHIE** : voir la rubrique "References" du texte anglais.

## **BBL Fertigmedium in Röhrchen zur Differenzierung von *Mycobacterium paratuberculosis***

Herrold-Eigelb-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV  
Herrold-Eigelb-Schrägagar (ohne Mycobactin J) mit ANV

Deutsch

## VERWENDUNGSZWECK

Herrold-Eigelbagar dient zur selektiven Isolierung und Differenzierung von *Mycobacterium paratuberculosis*. Andere Mykobakterien wachsen auf Herrold-Eigelbagar ohne Mycobactin, während *M. paratuberculosis* nur bei Zugabe ihres Wachstumsfaktors Mycobactin wächst.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Paratuberkulose (Johnie-Krankheit) ist eine chronische granulomatöse Enteritis von Wiederkäuern, die erstmals im Jahr 1826 beschrieben wurde.<sup>1</sup> Im Jahr 1895 beschrieben Johnie und Frothingham die Krankheit eingehender und wiesen säurefeste Bazillen in befallenen Eingeweiden nach.<sup>1</sup> Die erste erfolgreiche Isolierung dieses Organismus erfolgte im Jahr 1910.<sup>2</sup> Anfängliche Wachstumsprüfungen demonstrierten die stimulierende Wirkung der von anderen Mykobakterien (z.B. *M. phlei*) gewonnenen ethanollöslichen Substanz

"Mycobactin".<sup>3</sup> *M. paratuberculosis* ist auf dem Medium ohne diesen Wachstumsfaktor nicht zum Wachstum fähig.

Die zur Diagnose von Paratuberkulose am häufigsten angewendete Methode ist die Kultivierung von *M. paratuberculosis* aus Kotproben. Spezifische Verfahren zur Kultivierung von *M. paratuberculosis* aus Kotproben von Rindern sind in anderen Bezugsquellen beschrieben.<sup>4-7</sup>

## VERFAHRENSPRINZIP

Enzymatisch abgebautes Casein enthält Aminosäuren und andere stickstoffhaltige Substanzen. Rindfleischextrakt stellt weitere stickstoffhaltige Nährstoffe, Vitamine und Mineralstoffe zur Verfügung, die für mikrobielles Wachstum erforderlich sind. Natriumchlorid hält das osmotische Gleichgewicht aufrecht. Natriumpyruvat ist eine Energiequelle für den bakteriellen Stoffwechsel. Eigelb und Glycerol stellen

Fettsäuren und andere Nährstoffe zur Verfügung, die für den Stoffwechsel von Mykobakterien benötigt werden.

Die meisten Mykobakterien erzeugen endogene Siderophore (eisenbindende Zusammensetzungen), Mycobactin genannt, und wachsen mit oder ohne Zugabe von Mycobactin auf Eidotter-Agarmedium nach Herrold. *M. paratuberculosis* wächst nicht auf Medien in Abwesenheit von Mycobactin. Mycobactin J ermöglicht schnelleres und vermehrtes Wachstum von *M. paratuberculosis* im Vergleich zu anderen Mycobactinen.<sup>8,9</sup>

Amphotericin B verbessert die Selektivität des Mediums durch Hemmung von Begleitpilzen. Nalidixinsäure hemmt gramnegative Begleitbakterien und Vancomycin hemmt grampositive Begleitbakterien. Malachitgrün dient zur Unterdrückung von Begleitbakterien und verbessert die Sichtbarkeit der Kolonien.

## REAGENZIEN

### Zusammensetzungen:

Herrold-Eigelbagar mit Mycobactin J und ANV

Ungefähre Zusammensetzung\*

Pankreatisch abgebautes Casein	9,0	g
Rindfleischextrakt	2,7	g
Natriumchlorid	4,0	g
Natriumpyruvat	4,1	g
Malachitgrün	0,1	g
Amphotericin B	0,05	g
Mycobactin J	0,002	g
Agar	15,3	g
Nalidixinsäure	0,05	g
Vancomycin	0,05	g
Eigelb	100,0	mL
Glycerol	27,0	mL
Destilliertes Wasser	873,0	mL

\*Abgestimmt und/oder supplementiert auf die geforderten Testkriterien.

Herrold-Eigelbagar (ohne Mycobactin J) mit ANV enthält dieselben Bestandteile (außer Mycobactin J).

### Warnungen und Sicherheitshinweise:

Zur Verwendung in veterinärmedizinischen Labors.

Röhrchen mit feststehenden Deckeln sollten vorsichtig geöffnet werden, um bei einem Bruch des Röhrchens Verletzungen durch Glassplitter zu vermeiden.

**Aufbewahrung:** Medien sofort nach Erhalt bei 2 – 8 °C im Dunkeln lagern. Einfrieren und erhöhte Temperaturen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Licht schützen. Medien, die vor Gebrauch gemäß der Anleitung auf dem Etikett gelagert werden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und bis zu 16 Wochen lang inkubiert werden.

Nach aufrechter Lagerung scheint in Röhrchen mit Eiermedien ggf. eine große Flüssigkeitsmenge am Boden des Schrägagars vorhanden zu sein. Die Flüssigkeit wird in das Medium zurück absorbiert, wenn die Röhrchen waagrecht positioniert werden, so daß die Flüssigkeit die Oberfläche des Schrägagars bedeckt.

Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur aufwärmen lassen.

**Produktverfall:** Medien, die Anzeichen von Kontamination, Verfärbung, Austrocknen oder andere Anzeichen von Verfall aufweisen, dürfen nicht verwendet werden.

## PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Näheres ist den entsprechenden Abschnitten zu Probenentnahme und Handhabung zu entnehmen.<sup>10</sup>

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen erfolgen. Alle Proben sollten gemäß den Empfehlungen der CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health), des NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) und den jeweils bestehenden Laborvorschriften für den Umgang mit potentiell infektiösem Material gehandhabt werden. Probenbehältnisse und andere kontaminierte Materialien vor dem Entsorgen im Autoklav sterilisieren.

## VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Je nach bestelltem Produkt wird eines der unten aufgeführten Fertigmedien mitgeliefert (s. "LIEFERBARE PRODUKTE").

**Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte, die für dieses Verfahren benötigt werden.

**Testverfahren:** Aseptische Kautelen beachten.

- 1 – 2 g der Kotprobe abwiegen.
- Die Probe unter Anwendung eines der empfohlenen Verfahren<sup>4-7</sup> vorbereiten, um nicht-mykobakterielle Begleitorganismen zu entfernen oder abzutöten.
- Röhrchen des Herrold-Eigelbagars mit und ohne Mycobactin J mit höchstens 0,25 mL (5 – 7 Tropfen von einer sterilen Transferpipette) des vorbereiteten und dekontaminierten Probenmaterials inokulieren.
- Die Röhrchen bei 35 – 37 °C in Schrägposition mit locker aufgesetzten Deckeln inokulieren, um die Oberfläche des Mediums trocken zu lassen.
- Die Deckel nach 1 – 2 Wochen fest aufsetzen und die Röhrchen aufrecht in den Inkubator stellen.
- Die Röhrchen bis zu 16 Wochen lang wöchentlich auf Wachstum und Kontamination prüfen und beurteilen.

### Qualitätskontrolle durch den Anwender:

- Das Medium auf Anzeichen von Verfall prüfen, wie sie im Abschnitt "Produktverfall" beschrieben sind.
- Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit eine repräsentative Medienprobe mit 0,1 mL einer 1:100 Lösung nach McFarland Nr. 1 aus Wasser und Reinkulturen stabiler Kontrollorganismen, die bekannte, gewünschte Reaktionen liefern, inokulieren. Die folgenden Teststämme werden empfohlen.

Medium	Teststamm	Zu erwartende Ergebnisse
Herrold-Eigelbagar mit Mycobactin J und ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Wachstum innerhalb von 6 Wochen
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Wachstum innerhalb von 3 Wochen
Herrold-Eigelbagar ohne Mycobactin J mit ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Kein Wachstum innerhalb von 6 Wochen
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Wachstum innerhalb von 3 Wochen

## ERGEBNISSE

Gebildete Kolonien sollten auf die typische Säurefestigkeit und das morphologische Erscheinungsbild von *M. paratuberculosis* hin untersucht werden. Auf dem Medium ohne Mycobactin J sollten keine *M. paratuberculosis*-ähnlichen Kolonien entstehen.

Zur Bestätigung der Mycobactin J-Abhängigkeit verdächtige Kolonien in 0,5 mL autoklaviertem destilliertem oder deionisiertem Wasser suspendieren, so daß die Trübung einem 1,0 McFarland Nephelometer-Standard entspricht. Suspension in autoklaviertem destilliertem oder deionisiertem Wasser 100fach verdünnen. Ein Herrold-Eigelbagarröhrchen mit Mycobactin J bund ein Röhrchen ohne Mycobactin J mit je 0,1 mL der Suspension inokulieren. Die Röhrchen 1 Woche lang mit locker aufgesetzten Deckeln bei 35 – 37 °C inkubieren. Deckel fest aufsetzen und Röhrchen nochmals inkubieren. Die Röhrchen wöchentlich auf Wachstum prüfen. Säurefeste Kulturen, die nur in Gegenwart von Mycobactin J. wachsen, sind als *M. paratuberculosis* zu identifizieren.

## VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Die von individuellen Laboratorien erzielten Ergebnisse können abhängig von den Probenaufbewahrungsbedingungen, der zwischen der Entnahme und dem Erhalt der Probe im Labor verstrichenen Zeit, der Wirksamkeit der Dekontaminationsverfahren, der Art und Anzahl von Sporenbildnern in der Probe, der Häufigkeit der Probenablesung, der Organismenverteilung im Inokulum und anderen laborspezifischen Bedingungen von den Ergebnissen dieser beiden Studien abweichen.

Subkulturen von *M. paratuberculosis* können gelegentlich ihre Mycobactin-Abhängigkeit verlieren. Nach mehreren Übertragungen kann ein reduziertes Wachstum des Organismus zu beobachten sein.

Ein einziges Medium ist selten zum Nachweis aller Organismen von potentieller Bedeutung in einer Probe ausreichend. Die einzelnen Stoffe in Selektivmedien können einige Stämme der untersuchten Spezies hemmen oder das Wachstum einer Spezies, die gehemmt werden sollte, ermöglichen, insbesondere, wenn eine große Anzahl dieser Spezies in der Probe vorhanden ist. Auf Selektivmedien kultivierte Proben sollten deshalb ebenfalls auf nichtselektiven Medien kultiviert werden, um zusätzliche Informationen bereitzustellen und die Isolierung potentieller Pathogene zu gewährleisten.

## LEISTUNGSMERKMALE<sup>11</sup>

Kulturen wurden in zwei verschiedenen Laboratorien angelegt: einem staatlich unterstützten diagnostischen Laboratorium für Veterinärmedizin (Labor A) und einem veterinärmedizinischen Universitäts-Forschungslaboratorium (Labor B). Jedes Labor untersuchte Kotproben von 25 verschiedenen Tieren, deren Kulturen bekannt positiv für *M. paratuberculosis* waren. Die Proben stammten von Tieren, die als starke (> 50 KBE/Schrägagarplatte), mäßige (10 – 50), und schwache (< 10) Ausscheider charakterisiert wurden. Die Proben wurden aus der Aufbewahrung bei -70 °C genommen, schnell aufgetaut und mit Hilfe der Doppeldekontaminationsmethode nach Whitlock<sup>5</sup> vorbereitet. Jede Schrägagarplatte mit Herrold-Eigelbagar (HEYA) wurde mit etwa sechs Tropfen des vorbereiteten Sediments inokuliert. Jedes Laboratorium stellte seinen eigenen Herrold-Eigelbagar nach derselben Formulierung<sup>1</sup> mit Rohmaterialien von unterschiedlichen Quellen her.

In Labor A wurde ein Röhrchen mit BBL HEYA und je ein Röhrchen aus vier verschiedenen im Labor hergestellten BBL HEYA-Chargen mit demselben dekontaminierten Probenmaterial inokuliert. Die Röhrchen wurden ab der 2. Woche über einen Zeitraum von insgesamt 12 Wochen alle zwei Wochen abgelesen. *M. paratuberculosis* wurde bei 16 Proben auf allen fünf Medien isoliert. Bei den restlichen neun Kulturen war auf allen neun BBL HEYA-Schrägagarplatten Wachstum vorhanden, während auf einem oder mehreren der im Labor hergestellten Medien kein Wachstum zu erkennen war. Auf sieben der BBL HEYA-Schrägagarplatten war in der 4. Woche Wachstum zu erkennen. Nach 6 Wochen Inkubation wurde *M. paratuberculosis* auf den restlichen BBL HEYA-Medien und 15 der im Labor hergestellten Medien isoliert. Die restlichen Kulturen auf den im Labor hergestellten Medien waren nach 8 – 12 Wochen positiv.

In Labor B wurden je zwei Röhrchen aus einer Charge von BBL HEYA und vier im Labor hergestellten BBL HEYA-Chargen inokuliert. Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von 14 Wochen einmal wöchentlich beurteilt. Bei vier Proben war auf keinem der Medien Wachstum zu erkennen. Zwei Kulturen von Ausscheidern wurden auf den im Labor hergestellten Medien, jedoch nicht auf dem BBL HEYA isoliert, eine Kultur wurde auf Medien aus allen vier der im Labor hergestellten Chargen und eine auf Medien aus zwei der vier im Labor hergestellten Chargen isoliert. Ähnlich wurden zwei der auf dem BBL HEYA isolierten Kulturen nur auf Medien aus zwei der vier im Labor hergestellten Chargen isoliert. Dieser Unterschied bei der Isolierung war auf die geringe Anzahl der Organismen im Inokulum (höchstens zwei Kolonien pro Platte) zurückzuführen. Eine Probe, die bei allen vier Chargen der im Labor hergestellten Medien Wachstum zeigte, war mit Begleitorganismen überwachsen, bevor *M. paratuberculosis* nachgewiesen wurde. Acht der restlichen 15 Kulturen waren auf dem BBL HEYA eine oder mehrere Wochen früher positiv als auf allen der im Labor hergestellten Medien. Vier Kulturen waren auf dem BBL HEYA und auf Medien aus einer Charge der im Labor hergestellten Medien positiv, während das Wachstum auf den anderen im Labor hergestellten Medien um eine oder mehrere Wochen verzögert war. Drei Kulturen wurden auf den im Labor hergestellten Medien eine Woche früher als auf dem BBL HEYA isoliert.

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, daß die Isolierung von *M. paratuberculosis* auf BBL HEYA mit der Isolierung auf frisch zubereiteten Labormedien ähnlicher Zusammensetzung zu vergleichen ist. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß einige Kulturen auf BBL HEYA ggf. eine oder mehrere Wochen früher nachgewiesen werden können.

## LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr	Beschreibung
222232	BBL Herrold-Eigelbagar mit Mycobactin J und ANV, Packung zu 10 Schrägagarplatten (Röhrchen der Größe C).
222233	BBL Herrold-Eigelbagar mit Mycobactin J und ANV, Karton zu 100 Schrägagarplatten (Röhrchen der Größe C).
222240	BBL Herrold-Eigelbagar (ohne Mycobactin J) mit ANV, Packung zu 10 Schrägagarplatten (Röhrchen der Größe C).

222241	BBL Herrold-Eigelbagar (ohne Mycobactin J) mit ANV, Karton zu 100 Schrägagarplatten (Röhrchen der Größe C).
245158	BBL Herrold-Eigelb-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV, Packung zu 10 Mycoflask-Fläschchen.

LITERATURNACHWEIS: S. "References" im englischen Text.

# BD Terreno pronto in provetta BBL per la differenziazione di *Mycobacterium paratuberculosis*

Agar slant al tuorlo d'uovo di Herrold con micobattina J e ANV  
Agar slant al tuorlo d'uovo di Herrold (senza micobattina J) con ANV

Italiano

## USO PREVISTO

Gli agar al tuorlo d'uovo di Herrold sono utilizzati per l'isolamento selettivo e la differenziazione di *Mycobacterium paratuberculosis*. I micobatteri diversi da *M. paratuberculosis* crescono in agar al tuorlo d'uovo di Herrold, senza micobattina; *M. paratuberculosis* non cresce in assenza del relativo fattore di crescita, ovvero la micobattina.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La paratuberculosis (morbo di Johne) è un'enterite granulomatosa cronica dei bovini, descritta per la prima volta nel 1826.<sup>1</sup> Johne e Frothingham descrissero ulteriormente la malattia nel 1895 e dimostrarono la presenza di bacilli acido-resistenti negli intestini affetti.<sup>1</sup> Questo organismo fu isolato per la prima volta nel 1910.<sup>2</sup> I primi studi nutrizionali hanno dimostrato l'effetto stimolante di una sostanza solubile in etanolo ottenuta da altri micobatteri (ovvero *M. phlei*): la "micobattina".<sup>3</sup> L'organismo non cresce se nel terreno di coltura non è presente tale fattore di crescita.

La coltivazione di *M. paratuberculosis* da campioni fecali è il metodo maggiormente utilizzato per la diagnosi della paratuberculosis. Le procedure specifiche per la coltivazione di *M. paratuberculosis* da campioni fecali bovini sono descritte altrove.<sup>4-7</sup>

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il prodotto enzimatico della digestione di caseina fornisce aminoacidi e altre sostanze azotate. L'estratto di carne bovina fornisce ulteriori sostanze nutritive azotate, vitamine e minerali necessari alla crescita microbica. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il piruvato di sodio è una fonte di energia per il metabolismo batterico. Il tuorlo d'uovo e il glicerolo forniscono acidi grassi ed altre sostanze nutritive necessarie al metabolismo dei micobatteri.

La maggior parte dei micobatteri produce siderofori endogeni (composti leganti del ferro) chiamati micobattina e cresce sull'agar al tuorlo d'uovo di Herrold indipendentemente dall'aggiunta o meno di micobattina. *M. paratuberculosis* non può crescere su terreni privi di micobattina. La micobattina J consente una crescita precoce e più abbondante di *M. paratuberculosis* rispetto ad altre micobattine.<sup>8,9</sup>

L'anfotericina B aumenta la selettività del terreno di coltura grazie alla sua proprietà antimicotica. L'acido nalidixico inibisce gli organismi gram-negativi contaminanti e la vancomicina inibisce gli organismi gram-positivi contaminanti. È incluso verde malachite per agevolare il contenimento dei contaminanti e l'individuazione delle colonie.

## REAGENTI

### Formule:

Agar al tuorlo d'uovo di Herrold con micobattina J e ANV

Formula approssimata\*

Digerito pancreatico di caseina	9,0	g
Estratto di carne bovina	2,7	g
Cloruro di sodio	4,0	g
Piruvato di sodio	4,1	g
Verde malachite	0,1	g
Anfotericina B	0,05	g
Micobattina J	0,002	g
Agar	15,3	g
Acido nalidixico	0,05	g
Vancomicina	0,05	g
Tuorlo d'uovo	100,0	mL
Glicerolo	27,0	mL
Acqua purificata	873,0	mL

\*Controllata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

Agar al tuorlo d'uovo di Herrold (senza micobattina J) con ANV contiene i medesimi componenti, ad eccezione della micobattina J.

### Avvertenze e Precauzioni:

per uso di laboratorio veterinario.

Le provette con cappucci stretti devono essere aperte con cautela al fine di evitare lesioni causate dalla rottura del vetro.

**Modalità di conservazione:** al ricevimento, riporre il terreno di coltura al buio a 2 – 8° C. Non congelare o riscaldare. Non aprire fino al momento dell'uso. Minimizzare l'esposizione alla luce. I terreni di coltura conservati secondo le indicazioni fino al momento dell'uso possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per un periodo massimo di 16 settimane.

In seguito alla conservazione in posizione verticale, è possibile che le provette di terreno di coltura a base d'uovo sembrino contenere sul fondo dello slant un'abbondante quantità d'acqua. Il liquido viene riassorbito nel terreno di coltura se le provette vengono collocate di lato in modo che il liquido copra la superficie dello slant.

Prima di procedere all'inoculo, attendere fino a quando il terreno non abbia raggiunto la temperatura ambiente.

**Deterioramento del prodotto:** non utilizzare il terreno di coltura se vi compaiono tracce di contaminazione microbica, alterazione del colore, essiccazione o altri segni di deterioramento.

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Per dettagli sul prelievo e il trattamento dei campioni, consultare i testi in merito.<sup>10</sup>

Osservare le precauzioni stabilite contro i pericoli microbiologici durante tutte le procedure. Tutti i campioni devono essere trattati conformemente alle raccomandazioni CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health), le direttive NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) o le norme interne di laboratorio per quanto riguarda i materiali potenzialmente infetti. Prima di essere eliminati, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave.

## PROCEDURA

**Materiale fornito:** a seconda del prodotto ordinato, viene fornito uno dei terreni di coltura elencati sotto (vedere "DISPONIBILITÀ").

**Materiale richiesto ma non fornito:** terreni di coltura ausiliari, reagenti, organismi per controllo di qualità e attrezzatura da laboratorio necessaria per questa procedura.

**Procedura di analisi:** osservare tecniche asettiche.

1. Pesare 1 – 2 g di campione fecale.
2. Trattare il campione con una procedura consigliata<sup>4-7</sup> al fine di rimuovere o sopprimere gli organismi contaminanti ad eccezione dei micobatteri.
3. Inoculare le provette di agar al tuorlo d'uovo di Herrold, con e senza micobattina J, con al massimo 0,25 mL (5 – 7 gocce da una pipetta di trasferimento sterile) del materiale finale trattato e decontaminato.
4. Incubare le provette a 35 – 37° C in posizione slant dopo avere allentato i cappucci al fine di consentire l'essiccazione della superficie del terreno di coltura.
5. Dopo 1 – 2 settimane, stringere i cappucci e collocare le provette nell'incubatore, in posizione verticale.
6. Le provette possono essere lette e valutate per crescita e contaminazione ogni settimana per una durata di 16 settimane al massimo.

## Controllo di qualità per l'utilizzatore:

1. Controllare che il prodotto non mostri segni di deterioramento come illustrato al paragrafo "Deterioramento del prodotto".
2. Verificare i risultati inoculando un campione rappresentativo del terreno di coltura con 0,1 mL di una diluizione 1:100 di sospensione acquosa al McFarland n° 1 di colture pure di organismi di controllo stabili che producano reazioni desiderate e note. Si consigliano i ceppi di prova elencati a seguito.

Terreno Di Coltura	Ceppo di prova	Risultati attesi
Agar al tuorlo d'uovo di Herrold con micobattina J e ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Crescita entro 6 settimane
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Crescita entro 3 settimane
Agar al tuorlo d'uovo di Herrold (senza micobattina J) con ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Nessuna crescita in 6 settimane
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Crescita entro 3 settimane

## RISULTATI

Valutare le colonie rilevate per determinarne l'acido-resistenza e l'aspetto morfologico tipici di *M. paratuberculosis*. Le colonie simili a *M. paratuberculosis* non dovrebbero comparire sul terreno di coltura privo di micobattina J.

Per confermare la dipendenza da micobattina J, sospendere le colonie sospette in 0,5 mL di acqua distillata o deionizzata sterile da autoclave per ottenere una torbidità equivalente allo standard nefelometrico di McFarland 1,0. Diluire la sospensione 1:100 in acqua distillata o deionizzata sterile da autoclave. Inoculare 0,1 mL di sospensione in una provetta singola di agar al tuorlo d'uovo di Herrold con micobattina J e 0,1 mL in una provetta singola di terreno di coltura senza micobattina J. Incubare le provette per 1 settimana a 35 – 37° C, dopo avere allentato i cappucci. Stringere i cappucci e reincubare. Esaminare le provette a scadenza settimanale per rilevare la crescita. Le colture acido-resistenti che crescono soltanto in presenza di micobattina J sono identificate come *M. paratuberculosis*.

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I risultati per i singoli laboratori possono essere diversi da quelli ottenuti in questi due studi in base ai seguenti fattori: le condizioni di conservazione dei campioni, il tempo trascorso fra il prelievo del campione e l'arrivo dello stesso al laboratorio, l'efficacia delle procedure di decontaminazione, i tipi e la concentrazione di organismi sporigeni contenuti nel campione, la frequenza di lettura delle colture, la distribuzione degli organismi nell'inoculo ed altre condizioni variabili da laboratorio a laboratorio.

A volte le colture secondarie di *M. paratuberculosis* perdono la loro dipendenza dalla micobattina. Dopo più trasferimenti è possibile osservare una crescita ridotta dell'organismo.

Un singolo terreno di coltura è raramente sufficiente al rilevamento di tutti gli organismi potenzialmente significativi in un campione. Gli agenti in terreni di coltura selettivi possono inibire alcuni ceppi delle specie desiderate o consentire la crescita di una specie che dovevano inibire, soprattutto se la specie presente nel campione è numerosa. I campioni riprodotti su terreni di coltura selettivi devono pertanto essere riprodotti anche su terreni di coltura non selettivi al fine di ottenere ulteriori informazioni e consentire l'individuazione di eventuali agenti patogeni.

#### CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE<sup>11</sup>

Si sono allestite colture in due laboratori diversi: un laboratorio veterinario diagnostico statale (laboratorio A) ed un laboratorio di ricerca in una facoltà universitaria di veterinaria (laboratorio B). Ogni laboratorio ha trattato i campioni fecali ottenuti da 25 animali diversi nei quali si era stabilita la positività su coltura per *M. paratuberculosis*. I campioni rappresentavano animali caratterizzati da escrezione alta (>50 UFC/slant), moderata (10 – 50) o bassa (<10). I campioni sono stati rimossi dalla conservazione a -70° C, scongelati rapidamente e trattati utilizzando il metodo per doppia decontaminazione descritto da Whitlock.<sup>5</sup> Ciascuna coltura di agar slant al tuorlo d'uovo di Herrold (Herrold's Egg Yolk Agar, HEYA) è stata inoculata con sei gocce di sedimentato trattato. L'agar al tuorlo d'uovo di Herrold è stato preparato da ogni laboratorio in base alla stessa formulazione<sup>1</sup> con ingredienti provenienti da fonti diverse.

Nel laboratorio A, una provetta singola di HEYA BBL ed una provetta ciascuna di quattro lotti diversi di HEYA BBL preparati in laboratorio sono state inoculate con una aliquota dello stesso campione decontaminato. Le provette sono state osservate a scadenza quindicinale cominciando dalla seconda settimana, per un totale di 12 settimane. *M. paratuberculosis* è stato rilevato in tutti e cinque i terreni di coltura per 16 dei campioni. Per i nove terreni di coltura rimanenti si è rilevata crescita su tutte e nove le provette di terreno slant HEYA BBL, mentre in una o più provette di terreno di coltura preparato in laboratorio non si è verificata crescita dell'organismo. La crescita è diventata evidente entro la quarta settimana su sette delle provette di terreno slant HEYA BBL. Dopo 6 settimane di incubazione, *M. paratuberculosis* è stato rilevato sui rimanenti terreni di coltura HEYA BBL e su 15 dei lotti preparati in laboratorio. Le rimanenti colture su terreni preparati in laboratorio sono risultate positive dopo 8 – 12 settimane.

Nel laboratorio B, sono state inoculate provette in doppio di un singolo lotto di HEYA BBL e di quattro lotti diversi di HEYA BBL preparati in laboratorio. Le colture sono state osservate settimanalmente per un periodo di 14 settimane. Per quattro campioni non si è osservata alcuna crescita su alcun terreno di coltura. Due colture da animali escretori sono state rilevate su terreni preparati in laboratorio e non su HEYA BBL, una su tutti e quattro i lotti preparati in laboratorio e una su due dei quattro lotti di terreno di coltura preparati in laboratorio. Analogamente, due colture su HEYA BBL sono state rilevate soltanto su due di quattro lotti di terreno di coltura preparato in laboratorio. Tale variazione può essere attribuita alla bassa concentrazione di organismi nell'inoculo (non più di due colonie per coltura su slant). Un campione presente su tutti i lotti di terreno preparato in laboratorio ha mostrato crescita eccessiva di organismi contaminanti prima che potesse essere accertata la crescita di *M. paratuberculosis*. Delle 15 colture rimanenti, 8 sono risultate positive su HEYA BBL con una o più settimane di anticipo rispetto a qualsiasi altro lotto preparato in laboratorio. Quattro sono risultate positive su HEYA BBL e su un terreno di coltura preparato in laboratorio, mentre gli altri terreni di coltura preparati in laboratorio hanno richiesto tempi supplementari di una settimana o più. Tre colture si sono sviluppate con una settimana di anticipo su terreni di coltura preparati in laboratorio rispetto a HEYA BBL.

I risultati di questi studi indicano che la crescita di *M. paratuberculosis* su HEYA BBL è equivalente a quella su terreni di coltura freschi, di formulazione simile, preparati in laboratori e suggeriscono che alcune colture possono essere rilevate su HEYA BBL con una settimana o più di anticipo.

#### DISPONIBILITÀ

N° di cat.	Descrizione
222232	Agar slant BBL al tuorlo d'uovo di Herrold con micobattina J e ANV, conf. da 10 provette di misura C.
222233	Agar slant BBL al tuorlo d'uovo di Herrold con micobattina J e ANV, conf. da 100 provette di misura C.
222240	Agar slant BBL al tuorlo d'uovo di Herrold (senza micobattina J) con ANV, conf. da 10 provette di misura C.
222241	Agar slant BBL al tuorlo d'uovo di Herrold (senza micobattina J) con ANV, conf. da 100 provette di misura C.
245158	Agar slant BBL al tuorlo d'uovo di Herrold con micobattina J e ANV, conf. da 10 flaconi Mycoflask.

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

## **Medios preparados en tubo BBL para la diferenciación de *Mycobacterium paratuberculosis***

Tubos inclinados de agar yema de huevo de Herrold con micobactina J y ANV

Tubos inclinados de agar yema de huevo de Herrold (sin micobactina J) con ANV

Español

#### USO PREVISTO

Los agares yema de huevo de Herrold se utilizan para el aislamiento selectivo y la diferenciación de *Mycobacterium paratuberculosis*. Las micobacterias, con la excepción de *M. paratuberculosis*, crecerán en el agar yema de huevo de Herrold (sin micobactina); *M. paratuberculosis* no crecerá si no se le proporciona el factor de crecimiento micobactina.

#### RESUMEN Y EXPLICACION

La paratuberculosis (enfermedad de Johne) es una enteritis granulomatosa crónica de los rumiantes que fue descrita por primera vez en 1826.<sup>1</sup> Johne y Frothingham ampliaron la descripción de la enfermedad en 1895 y demostraron la presencia de bacilos ácido resistentes en el intestino afectado.<sup>1</sup> Se logró aislar este organismo por primera vez en 1910.<sup>2</sup> Los primeros estudios de su nutrición demostraron el efecto estimulante de una substancia soluble en etanol obtenida de otras micobacterias (por ej., *M. phlei*) llamada "micobactina".<sup>3</sup> El organismo no crece en el medio que carece este factor de crecimiento.

El cultivo de *M. paratuberculosis* de muestras fecales es el método utilizado más frecuentemente para diagnosticar la paratuberculosis. Se han descrito en otros lugares procedimientos específicos para el cultivo de *M. paratuberculosis* de muestras de heces bovinas.<sup>4-7</sup>

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La digestión enzimática de la caseína aporta aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas. El extracto de carne bovina aporta otros nutrientes nitrogenados, vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento microbiano. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico. El piruvato sódico es una fuente de energía para el metabolismo bacteriano. La yema de huevo y el glicerol aportan los ácidos grasos y otros nutrientes necesarios para el metabolismo de las micobacterias.

La mayoría de las micobacterias producen sideróforos endógenos (compuestos que ligan hierro) conocidos como micobactina, que crecerán en el agar yema de huevo de Herrold con o sin la adición de micobactina. *M. paratuberculosis* no crecerá en el medio sin micobactina. Mycobactin J asegura un crecimiento más rápido y abundante de *M. paratuberculosis* que otras micobacterias.<sup>8,9</sup>

La anfotericina B aumenta la selectividad del medio al inhibir los hongos contaminantes.

El ácido nalidixico inhibe la contaminación de organismos gram-negativos y la vancomicina inhibe la contaminación de organismos gram-positivos. Se incluye malaquita verde para ayudar a controlar los contaminantes y mejorar la visibilidad de las colonias.

#### REACTIVOS

##### Fórmulas:

Agar yema de huevo de Herrold con micobactina J y ANV

Fórmula aproximada\*

Digerido pancreático de caseína	9,0	g
Extracto de carne bovina	2,7	g
Cloruro sódico	4,0	g
Piruvato sódico	4,1	g
Verde malaquita	0,1	g
Anfotericina B	0,05	g
Micobactina J	0,002	g
Agar	15,3	g
Ácido nalidixico	0,05	g
Vancomicina	0,05	g
Yemas de huevo	100,0	mL
Glicerol	27,0	mL
Agua purificada	873,0	mL

\*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

El agar yema de huevo Herrold (sin micobactina J) con ANV contiene los mismos ingredientes salvo la micobactina J.

##### Advertencias y Precauciones:

Para uso de laboratorios veterinarios.

Los tubos que tienen tapones muy apretados deben abrirse con cuidado para evitar producir lesiones por rotura del vidrio.

**Instrucciones** para el almacenamiento: Al recibir los medios, consérvelos en un lugar oscuro a 2 – 8° C. Evite congelarlos o sobrecalentarlos. No los abra hasta el momento de utilizarlos. Reduzca al mínimo la exposición a la luz. Los medios que han sido almacenados antes del uso como lo indiquen sus etiquetas pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados hasta 16 semanas.

Después de su almacenamiento en posición vertical, los tubos con medio yema de huevo pueden tener mucha agua en el fondo de la superficie inclinada. Este fluido será reabsorbido por el medio si los tubos son colocados de lado para que el fluido cubra la superficie inclinada.

Deje que el medio alcance temperatura ambiente antes de realizar la inoculación.

**Deterioro del producto:** No utilice el medio si éste muestra indicios de contaminación microbiana, decoloración, desecación u otros signos de deterioro.

#### RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Consulte los textos apropiados para obtener detalles de los procedimientos de recogida y manipulación de las muestras.<sup>10</sup>

Siga las precauciones establecidas para el control de peligros microbiológicos durante todos los procedimientos. Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con las recomendaciones de los CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health), NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) o las normas locales para cualquier material potencialmente infeccioso. Los envases de las muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de desecharse.

#### PROCEDIMIENTO

**Material suministrado:** Según el producto ordenado, se proporciona uno de los medios preparados antes mencionados. (vea "DISPONIBILIDAD").

**Materiales necesarios pero no suministrados:** Se requieren medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para el control de calidad y equipo de laboratorio para llevar a cabo este procedimiento.

**Procedimiento de análisis:** Emplee una técnica aséptica.

1. Obtenga una muestra de 1 – 2 g de la muestra fecal.
2. Prepare la muestra siguiendo un procedimiento recomendado<sup>4-7</sup> para eliminar o matar los organismos contaminantes no micobacterianos.
3. Inocule tubos de agar yema de huevo de Herrold, con y sin micobactina J, con un máximo de 0,25 mL (5 – 7 gotas obtenidas con una pipeta de transferencia estéril) del material final procesado y descontaminado.
4. Incube los tubos a 35 – 37° C en posición inclinada con los tapones aflojados para permitir que la superficie del medio se seque.
5. Apriete los tapones después de 1 – 2 semanas y coloque los tubos en posición vertical en la estufa.
6. Inspeccione y evalúe los tubos para detectar crecimiento y contaminación cada semana durante 16 semanas.

#### Control de calidad por parte del usuario:

1. Examine el medio en busca de signos de deterioro como se describe en "Deterioro del producto".
2. Compruebe el rendimiento mediante la inoculación de una muestra representativa de un medio de cultivo con 0,1 mL de una dilución en agua 1:100 de suspensión McFarland n° 1 de cultivos puros de organismos de control estables que producen reacciones conocidas esperadas. Se recomienda el uso de las cepas de prueba siguientes.

Medio	Cepa de Prueba	Resultados Esperados
Agar yema de huevo de Herrold semanas con micobactina J y ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Crecimiento en un plazo de 6 semanas
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Crecimiento en un plazo de 3 semanas
Agar yema de huevo de Herrold plazo (sin micobactina J) con ANV	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> ATCC 19698	Ausencia de crecimiento en un plazo de 6 semanas
	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	Crecimiento en un plazo de 3 semanas

#### RESULTADOS

Las colonias que aparecen deben ser evaluadas para detectar la presencia de bacilos ácido resistentes y el aspecto morfológico de *M. paratuberculosis*. No deben encontrarse colonias de tipo *M. paratuberculosis* en el medio sin micobactina J.

Para confirmar la dependencia de micobactina J, prepare una suspensión de presuntas colonias en 0,5 mL de agua destilada o desionizada esterilizada en autoclave de manera que la turbidez sea equivalente al patrón nefelométrico N° 1,0 de McFarland. Diluya la suspensión 1:100 en agua destilada o desionizada esterilizada en autoclave. Inocule 0,1 mL de la suspensión en un solo tubo de agar yema de huevo de Herrold con micobactina J y 0,1 mL en un solo tubo del mismo medio sin micobactina J. Incube los tubos durante 1 semana con los tapones aflojados a 35 – 37° C. Ajuste los tapones y vuelva a incubar. Inspeccione los tubos semanalmente para detectar la presencia de crecimiento. Los cultivos de bacilos ácido resistentes que crecen sólo en presencia de micobactina J se identifican como *M. paratuberculosis*.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados obtenidos en cada laboratorio pueden diferir de los observados en estos dos estudios dependiendo de las condiciones de almacenamiento de la muestra, el tiempo entre su recogida y la llegada al laboratorio, la eficiencia de los procedimientos de descontaminación, los tipos y la cantidad de organismos productores de esporas de la muestra, la frecuencia de las inspecciones de los cultivos, la distribución de los organismos dentro del inóculo y otras condiciones que pueden variar de un laboratorio a otro.

Los subcultivos de *M. paratuberculosis* a veces pueden perder su dependencia de la micobactina. Puede observarse una reducción del crecimiento del organismo después de hacer varias transferencias.

Un solo medio rara vez es adecuada para detectar todos los organismos potencialmente significativos en una muestra. Los agentes de los medios selectivos pueden inhibir algunas cepas de la especie diana o permitir el crecimiento de una especie que han sido diseñados para inhibir, especialmente si la especie es abundante en la muestra. Las muestras cultivadas en medios selectivos deben, por lo tanto, cultivarse también en medios no selectivos para obtener información adicional y asegurar la recuperación de los posibles patógenos.

#### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO<sup>11</sup>

Los cultivos fueron realizados en dos laboratorios diferentes: un laboratorio público de diagnóstico veterinario (laboratorio A) y un laboratorio de investigación de una facultad de veterinaria (laboratorio B). Cada laboratorio procesó muestras fecales procedentes de 25 animales diferentes cuya positividad para *M. paratuberculosis* había sido confirmada por el cultivo. Las muestras procedieron de animales caracterizados por la eliminación alta (>50 UFC/tubo), moderada (10 – 50) y baja (<10) de organismos. Las muestras fueron sacadas del almacenamiento a -70° C, descongeladas rápidamente y procesadas utilizando el método de descontaminación doble descrita por Whitlock.<sup>5</sup> Se inocularon aproximadamente seis gotas de sedimento procesado en cada tubo inclinado de agar yema de huevo de Herrold (HEYA). Cada laboratorio preparó su agar yema de huevo de Herrold siguiendo la misma formulación<sup>1</sup> con diferentes fuentes de materia prima.

En el laboratorio A, se inoculó una porción de la misma muestra descontaminada en un solo tubo de BBL HEYA y en un tubo de cada uno de cuatro lotes diferentes de medios preparados en el laboratorio BBL HEYA. Los tubos se inspeccionaron dos veces a la semana, empezando la 2ª semana, durante un total de 12 semanas. Para 16 muestras, se recuperó *M. paratuberculosis* de los cinco medios. De los nueve cultivos restantes, se observó crecimiento en los nueve tubos inclinados BBL HEYA pero uno o más de los tubos de medios preparados en el laboratorio no tuvo crecimiento. El crecimiento fue evidente a la 4ª semana en siete tubos inclinados BBL HEYA. Después de 6 semanas de incubación, se recuperó *M. paratuberculosis paratuberculosis* de los restantes medios BBL HEYA y de 15 de los lotes preparados en el laboratorio. Los cultivos restantes hechos en medios preparados en el laboratorio fueron positivos a las 8 – 12 semanas.

En el laboratorio B, se inocularon dos tubos de un solo lote de BBL HEYA y de cuatro lotes diferentes de BBL HEYA preparados en el laboratorio. Se inspeccionaron los cultivos cada semana durante 14 semanas. Para cuatro muestras no se observó crecimiento en ningún medio. En dos cultivos hechos de muestras obtenidas de animales que eliminaban el organismo, éste se recuperó de los medios preparados en el laboratorio pero no de BBL HEYA, en un caso de los cuatro lotes de medios preparados en el laboratorio y en el otro caso de dos de los cuatro lotes preparados en el laboratorio. De modo similar, dos cultivos que evidenciaron recuperación en BBL HEYA sólo produjeron recuperación en dos de los cuatro lotes de medios preparados en el laboratorio. Esta variación en la recuperación se atribuyó al número bajo de organismos en el inóculo (no más de dos colonias en cualquier tubo inclinado). Una muestra que fue recuperada en todos los lotes de medios preparados en el laboratorio evidenció sobrecrecimiento por organismos contaminantes antes de que fuera detectado el crecimiento de *M. paratuberculosis*. De los 15 cultivos restantes, 8 fueron positivos una o más semanas antes en BBL HEYA que en cualquier lote preparado en el laboratorio. Cuatro fueron positivos en BBL HEYA y en un lote de medio preparado en el laboratorio, mientras el crecimiento en los otros medios preparados en el laboratorio se atrasó por una semana o más. Tres cultivos evidenciaron recuperación una semana antes en los medios preparados en el laboratorio que en BBL HEYA.

Los resultados de estos estudios indican que la recuperación de *M. paratuberculosis* en BBL HEYA es equivalente a la obtenida en medios de laboratorio recién preparados de formulación similar. Estos resultados sugieren que algunos cultivos pueden ser detectados antes, por una semana o más, en BBL HEYA.

#### DISPONIBILIDAD

N° de cat.	Descripción
222232	Agar yema de huevo de Herrold BBL con micobactina J y ANV, paquete de 10 tubos inclinados (tamaño C).
222233	Agar yema de huevo de Herrold BBL con micobactina J y ANV, caja de 100 tubos inclinados (tamaño C).
222240	Agar yema de huevo de Herrold BBL (sin micobactina J) con ANV, paquete de 10 tubos inclinados (tamaño C).
222241	Agar yema de huevo de Herrold BBL (sin micobactina J) con ANV, caja de 100 tubos inclinados (tamaño C).
245158	Agar inclinado yema de huevo de Herrold BBL con micobactina J y ANV, paquete de 10 frascos Mycoflask.

**BIBLIOGRAFIA:** Ver "Referencias" en el texto en inglés.



Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA  
(800) 638-8663

Becton, Dickinson France S.A.  
11 rue Aristide Bergès  
38800 Le Pont de Claix, France

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
BD, BD Logo, BBL and Mycoflask are trademarks of Becton, Dickinson and Company.  
©2004 BD.  
BD is an ISO 9000 registered manufacturer.