

Antibiotika-Nachweis-Nährböden

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1
 Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3
 Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 6, 9, 10, 11, 13

Die Methoden und Nährböden zur mikrobiologischen Bestimmung von Antibiotika in pharmazeutischen Produkten, Lebensmitteln und anderen Untersuchungsmaterialien werden durch die USP XXII¹, die FDA², sowie andere Referenzen³ spezifiziert. Grove und Randall⁴ legen die Zusammensetzungen der Nährböden fest, die am besten zum Nachweis von Antibiotika durch Testorganismen geeignet sind. Diese Nährböden sind mit den Ziffern 1-13, 19, 20 und 21 versehen worden. Um Verwechslungen zu vermeiden, werden die von Grove und Randall vergebenen Ziffern beibehalten.

Häufig verwendet werden die Antibiotika-Nachweis-Nährböden Nr. 1 und 3. Der Nährboden Nr. 11 kann durch einfaches Verändern des pH-Wertes aus Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1 hergestellt werden.

pH-Bereiche der Antibiotika-Nachweis-Nährböden

Nährboden	Nr. 1	Nr. 3	Nrn. 6 – 11
pH	6,6	7,0	7,9-8,0

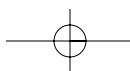
Die Antibiotika-Nachweis-Nährböden Nr. 1 und 11 entsprechen der DIN 58940⁵.

Der Antibiotikanachweis ist eine komplexe Untersuchung, bei der die in den offiziellen Veröffentlichungen aufgeführten Details beachtet werden müssen. Die generellen Prinzipien sind allerdings einfach und können in Plattendiffusion und Trübungsmessung unterteilt werden.

Plattendiffusionstests beruhen auf der Diffusion von Antibiotika aus Reservoiren, die sich auf oder in der Agarschicht befinden. Die Messung der Konzentration erfolgt durch den Vergleich der Größe von Hemmhöfen; dabei werden Standardstämme empfindlicher Mikroorganismen und Referenzantibiotika in bekannter Menge verwendet. Die Ergebnisse sind jeweils von den Diffusionsraten des Antibiotikums, den Wachstumsraten der Standardorganismen und den minimalen Hemmstoffkonzentrationen jedes Organismus abhängig.

Der betreffende Nährboden wird mit dem entsprechenden Testkeim beimpft und in Platten gegossen. Genau abgestufte Mengen des zu prüfenden Antibiotikums und eines Antibiotikum-Standards werden mit Hilfe von Reservoiren (Zylinder, Loch oder Blättchen) punktuell aufgebracht. Während der Bebrütung entstehen um die Einwirkzentren Hemmhöfe. Die Durchmesser der Hemmhöfe stellen ein Maß für die Aktivität des betreffenden Antibiotikums dar. Die Aktivität des betreffenden Antibiotikums kann bestimmt werden, indem die Größe der Hemmhöfe des Standards mit derjenigen des zu prüfenden Antibiotikums verglichen wird.

Der Basisnährboden wird in große quadratische Platten (250 x 250 mm) oder in flache Glasschalen 4 mm hoch gefüllt. Nach Erstarren des Basisnährbodens wird dieser dünn (1 mm) mit beimpftem Saatnährboden überschichtet. Da die Agarschicht unbedingt überall die gleiche Stär-



ke aufweisen sollte, sollte auf einem exakt ebenen Gießtisch gegossen werden. Bei Schalen dieser Größe können bis zu 36 verschiedene Reservoirs aufgebracht werden.

Zylindertest

Auf den erkalteten Nährböden werden sterile Stahl- oder Glaszylinder aufgesetzt und mit Antibiotika-Lösung gefüllt.

16-24 Stunden bei der für den Teststamm vorgeschriebenen Temperatur bebrüten. Anschließend werden die Zylinder abgenommen, die Hemmhöhe ermittelt und statistisch ausgewertet. Nach Erstellung einer Eichkurve aus den Daten der Standards kann die Aktivität der zu prüfenden Lösungen ermittelt werden.

Lochtest

In den beimpften Nährböden werden Löcher gestanzt, in welche die zu prüfenden Lösungen pipettiert werden. Bebrütung und Auswertung wie beim Zylindertest.

Blättchentest

Papierblättchen (OXOID, Art.-Nr. CT 998B), die jeweils mit Antibiotika-Lösung bzw. der zu prüfenden Lösung beträufelt oder getränkt wurden, werden auf den beimpften Nährböden gelegt und leicht angedrückt, damit sie auf der Agaroberfläche haften.

Bebrütung und Auswertung wie beim Zylindertest.

Trübungsmessungen stellen eine alternative Methode mit dem Vorteil kurzer Inkubationszeiten (3-4 Stunden) dar. Sie weisen jedoch nicht die Genauigkeit des Plattendiffusionstests auf⁶. Das Untersuchungsmaterial muß klar sein und darf nicht die Wellenlänge absorbieren, die im Spektralphotometer verwendet wird.

Reihenverdünnungstest (MHK-Wert-Bestimmung)

Abgestufte Verdünnungen der zu prüfenden Lösungen werden in Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3 pipettiert und mit einer exakt definierten Menge des jeweiligen Testkeims beschickt. Die letzte Verdünnungsstufe, die noch keine Wachstumstrübung zeigt, enthält das Antibiotikum in der Konzentration, die der MHK (Minimale Hemmkonzentration) entspricht.

Turbidimetrischer Test

Die Verdünnungen des Untersuchungsmaterials werden parallel zu je 1 ml in Röhrchen angesetzt. Je Röhrchen 9 ml mit dem Testkeim beimpfte Antibiotika-Nachweis-Bouillon zugeben und im Wasserbad 3-4 Stunden bei der vorgeschriebenen Temperatur bebrüten. Nach der Bebrütung wird das Wachstum des Testkeims durch Zugabe von 0,5 ml verdünnter Formaldehyd-Lösung (1:3) gestoppt. Anschließend wird sofort photometrisch die Trübung gemessen und ausgewertet. Die Antibiotikum-Konzentration wird aus der Extinktion mit Hilfe einer zuvor aufgestellten Eichkurve ermittelt.

Die **Teststämme** werden üblicherweise auf Schrägagar-röhrchen gehalten und alle 1-2 Wochen überimpft. Das für die Testung verwendete Inokulum wird meist von einer Übernachtskultur auf Schrägagar gewaschen. Dazu wird phys. Kochsalzlösung (1-2 ml) oder gepuffertes Peptonwasser aseptisch auf den Schrägagar gegeben und das

Röhrchen vorsichtig so geschwenkt, daß die Kolonien von der Oberfläche abgewaschen werden. Durch stärkeres Schütteln werden die Bakterien in Suspension gebracht und anschließend zu einer Standarddichte verdünnt. Von *Bacillus subtilis* und *B. cereus* werden Sporensuspensionen verwendet. Dabei ist es wichtig, diese Teststämme auf Nährböden zu kultivieren, die die Sporenbildung fördern, wie z. B. Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1, dem Mangansulfat (300 mg/l) zugesetzt wurde. Auf Platten mit einer Oberfläche aus Saatnährboden wird das Wachstum während der Inkubationszeit mikroskopisch untersucht, bis die Mehrheit der Keime sporuliert hat. Die Sporensuspension sollte zur Abtötung vegetativer Zellen pasteurisiert werden, da sich dann schärfer begrenzte Hemmhöfe ausbilden.

Literatur

1. USP XXII (1990) „Biological tests and assays“.
2. „Tests and methods of assay of antibiotics and antibiotic-containing drugs“. (1983) FDA, CFR, Title 21, Part 463, Subpart D, Washington, D.C.: US Government Printing Office, paras. 436.100-436-106, S. 242-259.
3. Hausler, W.J. (Ed.) APHA (1972) „Standard examination of dairy products“. 13th Edn., APHA Inc., Washington, D.C.
4. Grove, D.C. und Randall W.A. (1955) „Assay methods of antibiotics“. Medical Encyclopedia, New York.
5. DIN 58940: „Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Teil 2: Wirkstoffträger für den Agardiffusionstest.“
6. Reeves, D.S. und Bywater M.J. (1975) J. Antimicrob. Chemotherap. 1, 103-107.

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1

(Saatschicht-Agar)

Art.-Nr. CM 327

Saatschicht-Agar zur mikrobiologischen Bestimmung von Antibiotika. Der Nährboden entspricht der DIN 58940¹.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Pepton	6,0
Caseinpepton	4,0
Hefeextrakt	3,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	1,5
Glucose	1,0
Agar Nr. 1, neutral	11,5
pH 6,5 ± 0,2	

Zubereitung

27 g Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1 in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Beschreibung

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1 ist einer der bedeutendsten Nährböden bei der Antibiotika-Bestimmung; er wurde in einer neuen, speziell modifizierten Zusammensetzung eingeführt, um die Vorteile des OXOID Agars Nr. 1 zu nutzen. Hanus, Sands und Bennett² wiesen auf die hemmende Wirkung bestimmter Agarsorten gegenüber einigen Antibiotika, insbesondere Streptomycin, Kanamycin, Polymyxin B und Neomycin, hin. OXOID

Nährböden

Agar Nr. 1 weist diese Hemmeigenschaften nicht auf und ist daher besonders zur Antibiotika-Bestimmung geeignet. Durch die überlegenen Diffusionseigenschaften werden auf diesem Agar zusätzlich klarere Hemmhöfe gebildet. Ein weiterer Vorteil ist, daß in der OXOID-Zusammensetzung nur 11,5 g Agar Nr. 1 verwendet werden müssen, um die gleiche Gelstärke wie bei 15 g eines herkömmlichen Agars zu erzielen.

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1 wird als Saatschicht-Nährboden mit *Micrococcus flavus* für den Plattendiffusionstest auf Bacitracin, mit *Sarcina lutea* für den Test auf Chloramphenicol und mit *Staphylococcus aureus* für die Testung auf Kanamycin, Penicillin G, Methicillin und Oxacillin verwendet. Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1 kann als Grundschrift-Nährboden zum Diffusionstest u. a. auf Chloramphenicol, Kanamycin, Colistin, Methicillin, Oxacillin und Vancomycin eingesetzt werden.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt: 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Negativkontrolle

unbeimpfter Nährboden

Literatur

1. DIN 58940: „Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Teil 2: Wirkstoffträger für den Agar-Diffusionstest.“
2. Hanus, F.J., Sands, J.G. und Bennett, E.O. (1967) Appl. Microbiol. 15 (1), 31-34.

Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3

Art.-Nr. CM 287

Flüssignährboden zur Bestimmung von Antibiotika.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Fleischpepton	5,0
Hefeextrakt	1,5
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	1,5
Glucose	1,0
Natriumchlorid	3,5
Dikaliumhydrogenphosphat	3,68
Kaliumdihydrogenphosphat	1,32
pH 7,0 ± 0,2	

Zubereitung

17,5 g Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3 in 1 l auf 60°C vorgewärmtem Aqua dest. lösen. Auf Röhrchen verteilen und 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Beschreibung

Antibiotika-Nachweis-Bouillon Nr. 3 wird u. a. zur Bestimmung von Penicillin und Tetracyclin durch Trübungsmessung mit *Staphylococcus aureus* verwendet.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt: 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Staphylococcus aureus ATCC 25923 sollte bei Zusatz von Penicillin G eine Endpunkt-Hemmung bei 0,02-0,04 IE/ml aufweisen.

S. aureus ATCC 25923 sollte bei Zusatz von Tetracyclin eine Endpunkt-Hemmung bei 0,25-1,0 µg/ml aufweisen.

Negativkontrolle

unbeimpfte Bouillon

Antibiotika-Nachweis-Lösung Nr. 6

Antibiotika-Nachweis-Lösung Nr. 6 entspricht der Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP (OXOID, Art.-Nr. 129), der vor dem Autoklavieren (15 Minuten bei 121°C) Mangan(II)-sulfat (0,03 g/l) zugesetzt wurde und deren pH-Wert mit 1 N HCl-Lösung auf 7,0 ± 0,1 eingestellt wurde.

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 9

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 9 ist aus Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP (OXOID, Art.-Nr. CM 129) herzustellen, welchem vor dem Autoklavieren (15 Minuten bei 121°C) 1,4% Agar (OXOID, Art.-Nr. LP 11) zugefügt wurde.

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 10

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 10 kann ebenfalls aus Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP (OXOID, Art.-Nr. CM 129) zubereitet werden, der vor dem Autoklavieren (15 Minuten bei 121°C) 0,8% Agar (OXOID, Art.-Nr. LP 11) und 1% "Tween" 80 zugefügt wurde.

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 11

Der Nährboden entspricht der DIN 58940 (siehe Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1, Lit. 1)

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 11 kann durch eine pH-Wert-Änderung aus Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1 (OXOID, Art.-Nr. CM 327) hergestellt werden. Zu 1 l Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 1 NaOH-Lösung (1 N, 5 ml) zusetzen, so daß der pH-Wert 7,9 ± 0,1 beträgt. Die NaOH-Lösung kann vor dem Autoklavieren (15 Minuten bei 121°C) oder nachher aseptisch dem sterilen, auf 50°C abgekühlten Nährboden zugesetzt werden.

Antibiotika-Nachweis-Agar Nr. 11 wird u. a. als Grundschicht-Agar und als Saatschicht-Agar für den Plattendiffusionstest auf Neomycin verwendet.

Antibiotika-Nachweis-Lösung Nr. 13

Antibiotika-Nachweis-Lösung Nr. 13 entspricht der Sabouraud-Bouillon (OXOID, Art.-Nr. CM 147). Zusammensetzung und Zubereitung siehe dort.