

Baird-Parker-Nährboden mit RPF-Supplement

Ein alternatives Medium zur Identifizierung koagulase-positiver Staphylokokken. Der Nährboden entspricht DIN EN ISO 6888-2¹.

Baird-Parker-Nährboden-Basis (RPF)

Art.-Nr. CM 961

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Pankreatisch verdautes Casein	10,0
Hefeextrakt	1,0
Fleischextrakt	5,0
Natriumpyruvat	10,0
Glycin	12,0
Lithiumchlorid	5,0
Agar	20,0
pH 7,2 ± 0,2	

RPF-Supplement

Art.-Nr. SR 122

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 100 ml)	
Rinderfibrinogen	0,375 g
Kaninchenplasma	2,50 ml
Trypsin-Hemmer	2,50 mg
Kaliumtellurit	2,50 mg

Zubereitung

6,3 g Baird-Parker-Nährbodenbasis (RPF) in 90 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. Bei 121°C für 15 Minuten autoklavieren. Zu einem Röhrchen RPF-Supplement 10 ml steriles Aqua dest. aseptisch zugeben. Zum vollständigen Lösen stark schütteln. 10 Minuten stehen lassen. Den Röhrchenin-

halt aseptisch zu 90 ml steriler, flüssiger und auf 48°C abgekühlter Baird-Parker-Nährboden-Basis (RPF) geben. Gut mischen und Platten gießen oder beim Gußplattenverfahren bis zum Gießen bei 48°C halten.

Beschreibung

Baird-Parker-Nährboden mit Zusatz von RPF-Supplement
Der Baird-Parker-Nährboden mit Eigelb-Zusatz hat bekanntlich den Nachteil, daß isolierte Staphylokokken z. B. durch eine Koagulase-Reaktion (als *Staphylococcus aureus*) bestätigt werden müssen. Außerdem gibt es einige *S. aureus*-Stämme mit negativer Eigelb-Reaktion. Es sollten daher alle verdächtigen Kolonien untersucht werden^{2,3}.

Um einen *in situ*-Koagulase-Test zu erhalten wurde versucht, im Baird-Parker-Nährboden das Eigelb durch Schweineplasma zu ersetzen⁴. Hauschild⁵ verbesserte die Zuverlässigkeit der Koagulase-Reaktion, indem er dem Schweineplasma Rinderfibrinogen und Trypsin-Hemmer zusetzte. Beckers et al.⁶ zeigten, daß bei der Verwendung von Kaninchen- anstelle von Schweineplasma die Probleme mit falsch-positiven und falsch-negativen Reaktionen überwunden werden können. Sie entwickelten ein Supplement mit Kaninchenplasma, Fibrinogen, einem Trypsin-Hemmer und Tellurit für den Baird-Parker-Nährboden, das zu verlässlichen Koagulase-Reaktionen bei *S. aureus* führte.

Sawhney⁷ stellte Unterschiede in der Ausbeute von *Staphylococcus aureus*-Kulturen im Vergleich RPF-/Eigelb-Supplement fest. Er zeigte, daß es notwendig ist, die Tellurit-Konzentration im RPF-Supplement zu reduzieren, da die schützenden Faktoren des Eigelbs fehlen. Das OXOID RPF-Supplement folgt dieser Empfehlung.

Wird die Baird-Parker-Nährboden-Basis mit dem RPF-Supplement zubereitet, entsteht ein durchsichtiger Nährboden, auf dem die opaken Zonen der Koagulase-Reaktion klar erkennbar sind. Damit ist das gewünschte diagnostische Merkmal erreicht.

Kulturverfahren

Direktausstrichverfahren

1. Platten mit Baird-Parker-Nährboden-Basis und RPF-Supplement wie beschrieben herstellen.
2. Lebensmittel in einem Stomacher oder Labormixer homogenisieren. Probenumfang und Verdünnungsmittel gemäß der Untersuchungsvorschrift.
3. Platten mit je 0,1 ml aufbereiteter Probe und ihren dezimalen Verdünnungsstufen beimpfen.
4. Bei 36°C bebrüten und jeweils nach 24 und 48 Stunden auswerten.
5. Alle Kolonien zählen, die von einer opaken Präzipitationszone umgeben sind. Zählung nicht auf schwarze Kolonien beschränken.
6. Das Ergebnis als Anzahl Koagulase-positiver Staphylokokken je Gramm Lebensmittel angeben.

Plattengußverfahren

1. Nährboden aus Baird-Parker-Nährboden-Basis und RPF-Supplement wie vorgeschrieben herstellen und bis zum Gießen bei 48°C halten.
2. Lebensmittel in einem Stomacher oder Labormixer homogenisieren. Probenumfang und Verdünnungsmittel gemäß der Untersuchungsvorschrift.

3. Je 1 ml aufbereiteter Probe und ihrer dezimalen Verdünnungsstufen in sterile Petrischale geben.
4. Jeweils aseptisch 20 ml sterilen RPF-Nährboden zufügen und Gußplatten herstellen.
5. Bei 36°C bebrüten und jeweils nach 24 und 48 Stunden auswerten.
6. Alle Kolonien zählen, die von einer opaken Präzipitationszone umgeben sind.
7. Das Ergebnis als Anzahl Koagulase-positiver Staphylokokken je Gramm Lebensmittel angeben.

Bestätigung

Typische und atypische Kolonien können geprüft werden mittels:

- Röhrchenkoagulase: Prüfung der freien Koagulase
- Clumping-Faktor: Bestimmung der zellwandgebundenen Koagulase (z. B. mit OXOID Staphylase-Test, Art.-Nr. DR 595)
- Prüfung von Clumping-Faktor, Protein A und Kapselpolysaccharide (z. B. mit OXOID Dryspot Staphytect Plus, Art.-Nr. DR 100).

Koloniemorphologie auf Baird-Parker-Nährboden mit Zusatz von RPF-Supplement

Staphylococcus aureus

Aufgrund der reduzierten Tellurit-Konzentration können u. U. keine schwarzen Kolonien gebildet werden. *S. aureus* kann weiße, graue oder schwarze Kolonien bilden, die durch die Koagulase-Reaktion von einer opaken Zone präzipitierten Fibrins umgeben sind. Die meisten *S. aureus*-Kulturen können nach 24stündiger Bebrütung nachgewiesen werden.

Staphylococcus epidermidis

Nach 24stündiger Bebrütung tritt keine Koagulase-Reaktion auf, kann jedoch nach 40 Stunden opake Zonen bilden.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

RPF-Supplement: 2-8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Bei Baird-Parker-Platten mit RPF-Supplement werden die besten Ergebnisse mit frisch zubereiteten Platten erzielt⁴.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Negativkontrolle

Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Zusätzliche Hinweise

Alle verdächtigen Kolonien sind ungeachtet eventueller negativer Reaktionen auf diesem Nährboden als *Staphylococcus aureus* zu betrachten. Weitere Untersuchungen sind durchzuführen.

Kontaminierende Keime, die in nächster Nähe zu Koagulase-positiven Kolonien wachsen, können deren Koagulase-Reaktion teilweise beeinträchtigen.

Literatur

1. DIN EN ISO 6888-2: "Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken" (*Staphylococcus aureus* und andere Spezies) Teil 2: "Verfahren mit Kaninchenplasma/Fibrinogen-Agar"
2. Owens, J.J. und John, P.C.L. (1975) *J. Appl. Bacteriol.* 39, 23-30.
3. Stadhauders, J., Hassing, F. und van Aalst-van, Maren (1976) *Netherlands Milk and Dairy Journal.* 30, 222-229.
4. Devoyed, J.J., Millet, L. und Ocquot, G. (1976) *Canad. J. Microbiol.* 22, 1603-1611.
5. Hauschild, A.H.U., Park, C.E. und Hilscheimer R. (1979) *Canad. J. Microbiol.* 25, 1052-1057.
6. Beckers, N.J. et al. (1984) *Canad. J. Microbiol.* 30, 470-474.
7. Sawhney, D. (1986) *J. Appl. Bacteriol.* 61, 149-155.
8. Holbrook, R., Anderson, J.M. und Baird-Parker, A.C. (1965) *J. Appl. Bacteriol.* 32, 187-191.