

## Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, modifiziert

Art.-Nr. CM 329

Zur Isolierung von Salmonellen außer *S. typhi* aus klinischem Material, Stuhl, Fleisch, Fleischwaren und sonstigen Lebensmitteln.

Der Nährboden entspricht der ISO<sup>1-3</sup>, der DIN EN 12824<sup>4</sup> und der DGHM<sup>5</sup> sowie den Empfehlungen des § 35 LMBC<sup>6</sup> und dem Fleischhygienegesetz<sup>7</sup>.

Dieser Nährboden ist eine Weiterentwicklung des Brillantgrün-Agars nach Kauffmann<sup>8</sup>, die von den Autoren Edel und Kampelmacher<sup>9</sup> vorgenommen und auf europäischer Ebene vergleichend getestet wurde.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	5,0
Pepton	10,0
Hefeextrakt	3,0
Dinatriumhydrogenphosphat	1,0
Natriumdihydrogenphosphat	0,6
Lactose	10,0
Saccharose	10,0
Phenolrot	0,09
Brillantgrün	0,0047
Agar	12,0
pH 6,9 ± 0,2	

### Zubereitung

52 g Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. NICHT AUTOKLAVIEREN! Auf 50°C abkühlen, gut mischen und Platten gießen.

d

### Salmonella-Sulfamandelat-Supplement

Art.-Nr. SR 87

#### Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Sulfacetamid	500 mg
Mandelat	125 mg

#### Zubereitung

Einem Röhrchen Salmonella-Sulfamandelat-Supplement aseptisch 5 ml steriles Aqua dest. zusetzen. Vorsichtig mischen, bis der Inhalt vollständig gelöst ist, dabei Schaumbildung vermeiden. Den gelösten Inhalt eines Röhrchen zu 500 ml sterilem, auf 50°C abgekühltem Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. geben. Vorsichtig mischen und Platten gießen.

#### Beschreibung

Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. basiert auf einer Zusammensetzung, die vom Rijks Instituut voor de Volksgezondheid in Utrecht<sup>9,10</sup> modifiziert wurde. Der Nährboden ist in Europa weitgehend anerkannt und wird nun von der ISO<sup>1-3</sup>, dem DIN<sup>4</sup>, der DGHM<sup>5</sup>, dem BGA<sup>6</sup> und dem Fleischhygienegesetz<sup>7</sup> empfohlen.

Im Vergleich zu anderen Zusammensetzungen weist der Nährboden eine stärkere Hemmung von *Escherichia coli* und *Proteus* spp. auf. Pseudomonaden, die auf Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar USP Salmonellen ähneln, werden im Wachstum gehemmt. Der Nachweis kleinerer Anzahlen Salmonellen wird aufgrund der schwächeren Hemmwirkung und durch das höhere Nährstoffangebot verbessert<sup>11</sup>.

#### Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Selektivnährboden, mod.

Watson und Walker<sup>12</sup> setzten dem Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. eine Kombination aus Sulfacetamid (1,0 mg/ml) und Mandelat (bis zu 0,25 mg/ml) zu, um eine maximale Wiederauffindungsrate von Salmonellen aus Tetrathionat-Lösung, mod. (Muller-Kauffmann-Lösung) bei gleichzeitig möglichst hoher Unterdrückung der kontaminierenden Flora zu erhalten. Salmonella-Sulfamandelat-Selektiv-Supplement wird zur Isolierung und Koloniezahlbestimmung von Salmonellen aus Abwasser und Klärschlamm verwendet und basiert auf der Zusammensetzung nach Watson und Walker<sup>9,12</sup>. Diese Autoren zeigten, daß bei Verwendung von Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. mit einem Zusatz von Sulfacetamid (1,0 mg/ml) und Mandelat (0,25 mg/l) und bei einer Bebrütungstemperatur von 43°C eine maximale Wiederauffindung von Salmonellen aus Tetrathionat-Lösung, mod. (Muller-Kauffmann-Lösung) erzielt werden kann.

Für die Salmonellen-Anreicherung nach § 35 LMBG werden Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung bzw. Selenit-Cystin-Lösung (OXOID, Art.-Nrn. CM 669 bzw. CM 699) empfohlen<sup>6</sup>.

Watson und Walker<sup>12</sup> beschrieben eine einfache und verlässliche Methode zur Isolierung subletal geschädigter Salmonellen aus behandeltem Abwasser und Klärschlamm.

Die Verwendung des Antibiotika-Supplements als Zusatz für Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar wird empfohlen, weil die Voranreicherung des Abwassers in gepuffertem Peptonwasser nicht nur das Wachstum geschädigter Salmonellen, sondern auch das der Begleitflora fördert. Der Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. mit Zusatz von Salmonella-Sulfamandelat-Selektiv-Supplement zeichnet sich durch eine stärkere Unterdrückung der Begleitflora und ein geringeres Auftreten falsch-positiver Ergebnisse aus. Dieser Vorteil wurde von Fricker et al. bei der Verwendung von Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Agar, mod. mit Natriumsulfacetamid und Natriummandelat beim Ausstrich von Anreicherungskulturen aus Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung aus Abwasser und verunreinigtem Wasser<sup>13,16</sup> sowie Möwenfaeces<sup>14</sup> und Hühnchen<sup>15,17</sup> festgestellt. Vassiliadis et al.<sup>18</sup> setzten dem Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Agar, mod. Natriumdesoxycholat (2,5 g/l) zu, um das Schwärmen von *Proteus hauseri* bei der Untersuchung von Abwässern zu verhindern. Desoxycholat ist den Sulfonamiden bei der Unterdrückung des Schwärmens überlegen, ohne dabei das Wachstum vieler Salmonellen-Serotypen zu beeinträchtigen.

#### Kulturverfahren

##### Lebens- und Futtermittel

(Verfahren nach Edel und Kampelmacher<sup>11</sup>)

1. Einen Teil Lebensmittelprobe zu 20 Teilen Tetrathionat-Lösung, mod. (Muller-Kauffmann-Lösung, OXOID, Art.-Nr. CM 343) geben und schütteln.
2. 15 Minuten bei 45°C im Wasserbad bebrüten.
3. Anschließend im Brutschrank bei 43°C bebrüten.
4. Zur Anreicherung nach § 35 LMBG<sup>7</sup> 0,1 ml bzw. 10 ml der Voranreicherung zu 10 ml Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung bzw. 100 ml Selenit-Cystin-Lösung (OXOID, Art.-Nrn. CM 669 bzw. CM 699) geben und bei 42°C bzw. 36°C für mind. 18 Stunden bebrüten.
5. Nach 18-48 Stunden auf Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. subkultivieren. Dabei eine Impföse nach einmaligem Eintauchen in die Bouillon auf zwei Petrischalen (Ø 9 cm) ohne erneutes Eintauchen oder nur auf einer größeren Petrischale (Ø 14 cm) ausstreichen.
6. Platten bei 36°C 18-24 Stunden bebrüten.
7. Rote Kolonien mit Verdacht auf Salmonellen in einer Lysin-Decarboxylase-Lösung nach Taylor und auf Dreizucker-Eisen-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 277) subkultivieren. 18-24 Stunden bei 36°C bebrüten.

Falls bei diesen Nährböden eine für Salmonellen positive Reaktion auftritt, sind Agglutinationstests mit Kolonien von der Oberfläche des Dreizucker-Eisen-Agars durchzuführen.

#### Abwasser<sup>12</sup>

1. Eine repräsentative Probe Abwasser oder Klärschlamm entnehmen.
2. Ausreichendes Volumen in einem Mixer oder im Stomacher homogenisieren.
3. Fünf Proben von je 10 ml in je 35 ml gepuffertes Peptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 509), fünf Proben von je 1 ml und fünf Proben von je 0,1 ml in je 10 ml

- gepuffertes Peptonwasser pipettieren. Über Nacht bei 36°C bebrüten.
- Mit 10 ml der Ansätze jeweils 35 ml Tetrathionat-Lösung, mod. (Muller-Kauffmann-Lösung, OXOID Art.-Nr. CM 343) beimpfen und bei 43°C bebrüten.
  - Bouillonansätze jeweils nach 24 und 48 Stunden Bebrütung auf Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar, mod. mit Salmonella-Sulfamandelat-Supplement subkultivieren.
  - Platten über Nacht bei 43°C bebrüten.
  - Verdächtige (rote) Kolonien durch weitere diagnostische Tests identifizieren.

Salmonella-Sulfamandelat-Supplement hemmt die Begleitflora, die sich während der Wiederbelebungs- und Erholungsphase in gepuffertem Peptonwasser vermehrt hat.

### Koloniemorphologie

*Salmonella* spp. (außer *S. typhi*)

Rote, von leuchtend roter Zone umgebene Kolonien. Lactose-/Saccharose-positive Keime  
Meist im Wachstum gehemmt, sonst gelbgrüne Kolonien.

*Proteus* spp.

Meist vollständig gehemmt, bei Wachstum rote Kolonien ohne Schwärmen.

*Pseudomonas* spp.

Meist im Wachstum gehemmt, sonst kleine, gezackte, rote Kolonien.

### Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Supplement: 2-8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

### Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Negativkontrolle

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Proteus vulgaris* ATCC 13315

### Zusätzliche Hinweise

Lactose-positive Salmonellen können in Lebensmitteln vorkommen<sup>19</sup>.

*Salmonella typhi* und Shigellen wachsen auf diesem Nährboden nicht.

*Proteus*, *Citrobacter* und *Pseudomonas* spp. können kleine rote Kolonien bilden und dadurch enteropathogene Keime vortäuschen.

### Literatur

- ISO/DIS 3565 (1994) "Meat and meat products. Detection of Salmonella. Reference method."
- ISO 6579 (1993) "Microbiology. General guidance on methods for the detection of Salmonella. Reference method."
- ISO 6785 (2001) "Milch und Milchprodukte - Nachweis von Salmonellen spp."
- DIN EN 12824 (1998) „Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonellen“.
- DGHM (Lieferung 2, 1983) "Verfahrensrichtlinien für die Mikrobiologische Diagnostik". Kap. 2.1, S.19.
- BGA: "Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG". L 00.00-20: "Nachweis von Salmonellen".
- Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchung nach dem Fleischhygienegesetz (VwVFRHG) vom 11.12.1986. BAnz. Nr. 238a, 23.12.1986.
- Kauffmann, F. (1935) Z. Hyg. Infekt. Krhn. 117, 26-32.
- Edel, W. und Kampelmacher, E.H. (1968) Bull. Wld. Hlth. Org. 39, 487-491.
- Edel, W. und Kampelmacher, E.H. (1969) Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 297-306.
- Read, R.B. und Reyes, A.L. (1968) Appl. Microbiol. 16, 746-748.
- Watson, U.C. und Walker, A.P. (1978) J. Appl. Bacteriol. 45, 195-204.
- Fricker, C.R. (1984) Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I. Orig. B 179, 170-178.
- Fricker, C.R. und Girdwood, R.W.A. (1984) J. Hyg. 93, 35-42.
- Fricker C.R. (1984) Int. J. Food Microbiol. 1, 171-177.
- Fricker, C.R. und Girdwood, R.W.A. (1985) J. Appl. Bacteriol. 58, 343-346.
- Fricker C.R. et al. (1985) J. Hyg. 95, 337-344.
- Vassiliadis, P. et al. (1979) Ann. Soc. belge Med. trop. 59, 117-120.
- Harvey, R.W.S., Price, T.H. und Hall, L.M. (1973) J. Hyg. Camb. 71, 481-486.