

### Clausen-Nährboden, halbfest

[Dithionit-Thioglycolat-(HS-T)-Lösung]

### Clausen-Nährboden-Basis, halbfest

Art.-Nr. CM 353

**Nährboden mit neutralisierenden Komponenten und supplementierenden Mineralsalzen für die Sterilitätsprüfung besonders von Pharmazeutika.**

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Caseinpepton	15,0
Hefeextrakt	6,0
Sojamehlpepton	3,0
Glucose	6,0
Natriumchlorid	2,5
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0
Natriumcitrat	1,0
L-Cystein	0,5
L-Asparagin	1,25
Natriumdithionit	0,4
Natriumthioglycolat	0,5
Lecithin	0,3
Magnesiumsulfat	0,4
Calciumchlorid	0,004
Kobalt(II)-sulfat	0,001
Kupfer(II)-sulfat	0,001
Eisen(II)-sulfat	0,001
Zinksulfat	0,001
Mangan(II)-chlorid	0,002
Resazurin	0,001
Agar	0,75
pH 7,1 ± 0,2	

#### Zubereitung

3 g 'Tween' 80 und 5 g Glycerin in 1 l Aqua dest. lösen. 40 g Clausen-Nährboden, halbfest darin suspendieren und bis zum Lösen erhitzen. In Röhrrchen oder Fläschchen jeweils ein für den Standard-MCT-Test (s.u.) geeignetes Volumen (maximal 15 ml) abfüllen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und nach dem Autoklavieren schnell auf 20°C abgekühlen. GEBRAUCHSFERTIGEN NÄHRBODEN NICHT WIEDER ERHITZEN!

#### Beschreibung

Dithionit-Thioglycolat-(HS-T)-Lösung ist von Clausen als Nährboden mit hochwertigen Nähreigenschaften entwickelt worden. Er enthält reduzierende Agenzien und essentielle Metalle für die Wiederauffindung anaerober Sporenbildner. Lecithin und 'Tween' 80 schützen vor den Effekten kationischer Agenzien, die *in vitro* starke bakteriostatische Effekte zeigen können.

Er wird von der Pharmacopeia Nordica zur Sterilitätsprüfung empfohlen. Die Methode basiert auf der stichprobenweisen Entnahme von Mustern und sie wird als 'Microbial Contamination Test' (MCT, Prüfung auf mikrobielle Reinheit) beschrieben. Mit diesem Standard-MCT kann festgestellt werden, ob die Anzahl der nicht-sterilen

Einheiten - soweit vorhanden - unter einer bestimmten Grenze liegen.

Die folgende Darstellung des Standardnachweises für die mikrobiologische Kontamination ist eine Kurzfassung der detaillierten Beschreibung, die als Nachtrag in der Pharmacopeia Nordica veröffentlicht wurde. Die Sterilitätsprüfung muss mit allen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt werden, um Laborkontaminationen zu vermeiden, die eine Rate von einer Kontamination pro 100 Prüfungen übersteigt. Die Verwendung einer Laminar-Flow-Bank wird empfohlen. Die Sterilitätskontrolle erfordert erfahrenes Personal. Weiterhin empfiehlt es sich, die Leistungsfähigkeit der Methode in gewissen Zeitabständen zu kontrollieren. Es sollten zufällig entnommene Proben von aussagefähigen, repräsentativen Mengen begutachtet werden. Bei der Prüfung auf mikrobielle Reinheit können zwei Methoden angewandt werden, um nicht-sterile Einheiten nachzuweisen.

#### Membranfiltermethode

1. Das Untersuchungsmaterial in 200 ml 0,1%igem (w/v, pH 7,0-7,2), sterilem Peptonwasser (OXOID, Art.-Nr. CM 9) lösen oder suspendieren und sofort durch einen oder mehrere Membranfilter (durchschnittliche Porengröße 0,45 µm oder weniger) filtrieren.
2. Jeden Filter dann dreimal auswaschen, indem jeweils 100 ml Peptonwasser durch die Membran passiert werden.
3. Hiernach die Membranen in je ein Röhrrchen mit wenigstens 15 ml Clausen-Nährboden und in ein Röhrrchen mit Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP (OXOID, Art.-Nr. CM 129) einbringen. Falls nur ein Filter verwendet wurde, diesen teilen und die eine Hälfte in ein Röhrrchen mit Clausen-Nährboden, die andere in ein Röhrrchen mit Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP einbringen.
4. Die Röhrrchen mit Clausen-Nährboden mindestens 14 Tage bei 30-32°C bebrüten. Die Röhrrchen mit Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung USP mindestens 14 Tage bei 20-25°C bebrüten.

#### Verdünnungsmethode

1. Das zuvor gelöste oder suspendierte Untersuchungsmaterial zu je 1 ml in mindestens 10 Röhrrchen, die wiederum jeweils 15 ml Clausen-Nährboden enthalten, einbringen.
2. Die eine Hälfte der Röhrrchen bei 30-32°C mindestens 14 Tage, die andere Hälfte bei 20-25°C ebensolange bebrüten.
3. Bei Trübung müssen Subkulturen angelegt werden. Subkulturen sollten auf jeden Fall auch nach der normalen Bebrütungsdauer angelegt und 14 Tage beobachtet werden.

#### Beurteilung der Ergebnisse

Der Standard-MCT ist negativ, wenn in keinem der Röhrrchen Wachstum zu beobachten ist. Falls Wachstum auftritt, kann die Kontrolle mit der zweifachen Probenmenge wiederholt werden. Die Prüfung ist abgeschlossen, wenn in keinem dieser Röhrrchen Wachstum zu sehen ist. Wachstum ist bei Lösungen oder halbfesten Nährböden anhand der Trübung und bei festen Nährböden anhand der Koloniebildung oder durch mikroskopische Begutachtung der Kulturen festzustellen.

### Kontrollen

Beide Methoden der Sterilitätsprüfung müssen auf die Anwesenheit mikrobieller Inhibitoren geprüft werden. Dazu wird entweder bei der Membranfiltermethode Peptonwasser vor der Filtration oder bei der Verdünnungsmethode ein Röhrchen mit Clausen-Nährboden mit einem kleinen Inokulum beimpft.

Wenn dabei kein Wachstum zu sehen ist, muß die Kontrolle nach Aufhebung des wachstumhemmenden Effekts wiederholt werden.

Die empfohlenen Testorganismen sind:

- *Staphylococcus epidermidis*;
- *Clostridium sporogenes*;
- *Rhodotorula rubra*.

Diese Mikroorganismen in Dauerkulturen auf Schrägagar oder in Agarstichkulturen halten. Das Testinokulum aus 24stündigen Kulturen in Clausen-Nährboden entnehmen. Bei 30-32°C bebrüten. Das Inokulum von *Rhodotorula rubra* nach 48stündiger Bebrütung bei 20-25°C entnehmen.

### Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

### Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

siehe obige Kontrollen

Negativkontrolle

unbeimpfter Nährboden

### Zusätzliche Hinweise

Der Nährboden ist gelblich gefärbt und fast klar. Unter aeroben Bedingungen verfärbt er sich schwach rosa. Bei Verwendung sollte nur das obere Drittel des Nährbodens rosa gefärbt sein.

### Literatur

Clausen, O.G. (1956) "Modified hydrogensulphite medium (BONNEL) as a new aerobic and anaerobic control medium for sterility tests". Acta Pathol. Microbiol. Scand. 38, 107-118.

Clausen, O.G., Aasgaard, N.B. und Solberg, O. (1973) Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 124 B, 205.

Christensen, E.A., Kristensen, H. und Jensen, K.M. (1969) Arch. Pharm. Chem. 76, 625.

Clausen, O.G. (1973) "A study of the growth-promoting properties of fluid and solid microbial-contamination test media on small numbers of micro-organisms". Pharmaceutica Acta Helvetiae. 48, 541-548.

Clausen, O.G. (1973) "An Examination of the bactericidal and fungicidal effects of cetylpyridinium chloride, separately and in combinations embodying EDTA and benzyl alcohol". Pharm. Ind. 35(12), 869-874.

Mohamed, A. und Abdou, F. (1974) "Comparative study of seven media for sterility testing". J. of Pharma. Sci. 63, 1. Jan.

Mohamed, A. und Abdou, F. (1974) "Sterilitätstest III. Vergleichsuntersuchungen von drei Medien zum Nachweis von Bakterien". Pharm. Ind. 36(5), 337-344.

Pharmacopeia Nordica, Addendum 1972.