

Clostridium-Difficile- Selektivnährboden (CCFA)

(CCFA, Cycloserin-Cephoxitin-Fructose-Agar)

Zur Isolierung von *Clostridium difficile*.

Der Nährboden entspricht den Empfehlungen der DGHM¹.

Clostridium-Difficile-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 601

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Proteose-Pepton	40,0
Dinatriumhydrogenphosphat	5,0
Kaliumdihydrogenphosphat	1,0
Magnesiumphosphat	0,1
Natriumchlorid	2,0
Fructose	6,0
Agar	15,0
pH 7,4 ± 0,2	

Clostridium-Difficile-Selektiv- Supplement (CCFA)

Art.-Nr. SR 96

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml Nährboden)	
D-Cycloserin	125 mg
Cephoxitin	4 mg

Zubereitung

34,5 g Clostridium-Difficile-Agar-Basis in 500 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren. Den Inhalt eines Röhrchens Clostridium-Difficile-Selektiv-Supplement aseptisch in 2 ml sterilem Aqua dest. lösen. Den gelösten Inhalt und 7% defibriniertes Pferdeblut (OXOID, Art.-Nr. SR 50) aseptisch zu 500 ml steriler, abgekühlter Nährboden-Basis zugeben. Gut mischen und Platten gießen. Anstelle des defibrinierten Pferdeblutes kann defibriniertes Schafblut (OXOID, Art.-Nr. SR 51) verwendet werden; einige Stämme können dann jedoch bei der Wiederbelebung verlangsamtes Wachstum zeigen.

Beschreibung

Clostridium difficile wurde erstmalig 1935 von Hall und O'Toole² isoliert, die aufgrund der sehr schwierigen Isolierung die Bezeichnung 'difficile' vorschlugen. 1940 isolierte Snyder³ *C. difficile* von Kindern im Alter zwischen zehn Wochen und einem Jahr. Über weitere Isolierungen wurde bis zum Jahr 1960 nicht berichtet, bis dieser Keim durch McBee⁴ aus dem Darminhalt einer Robbe isoliert wurde und Smith und King⁵ ihn bei menschlichen Infektionen nachwiesen. Es wurde gezeigt, daß toxische Isolate von *C. difficile* die Hauptursache für eine Antibiotika-assoziierte Colitis (AAC) bei Versuchstieren⁶ und einer pseudomembranösen Colitis beim Menschen sind^{7,8}. Keighley⁹ entdeckte, daß *C. difficile* in Verbindung mit Colitis und Diarrhöe ohne pseudomembranöse Veränderungen infolge einer Antibiotikatherapie nach gastrointestinalen Operationen auftrat.

Hafiz und Oakley¹⁰ entwickelten einen Nährboden zur selektiven Isolierung. Die Zusammensetzung basierte auf der Beobachtung, daß *C. difficile* gegenüber Kresol, das während des Wachstums gebildet wird, eine hohe Toleranz aufweist. Sie verwendeten Clostridium-Agar (OXOID, Art.-Nr. CM 151) mit 0,2% Phenol- oder p-Kresol-Zusatz.

George et al.¹¹ beurteilten diesen Nährboden in einer Studie über Selektivnährböden zur routinemäßigen Isolierung von *C. difficile* aus Faeces im Vergleich zum Wachstum auf Blutagar als zu stark hemmend. Sie empfahlen zur Isolierung von *C. difficile* die Verwendung eines Nährbodens mit Fructose, Eigelb und den selektiven Agenzien D-Cycloserin und Cephoxitin. Die Kombination der Clostridium-Difficile-Agar-Basis mit dem Clostridium-Difficile-Selektiv-Supplement entspricht der von George et al.¹¹ empfohlenen Zusammensetzung. Die selektiven Agenzien D-Cycloserin (500 µg/ml) und Cephoxitin (16 µg/ml) hemmen die meisten *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, Staphylokokken, gramnegative, anaerobe Nicht-Sporenbildner und Clostridien (außer *C. difficile*) in großer Zahl in Faeces vorkommen können. Levett¹² erwähnt Veröffentlichungen^{13,14}, denen zufolge einige Stämme von *C. difficile* einen niedrigen MHK-Wert sowohl bei Cycloserin als auch bei Cephoxitin aufweisen. Er reduzierte die Konzentrationen von Cycloserin (250 µg/ml) und Cephoxitin (8 µg/ml) und kombinierte dies mit einer Alkoholschock-Behandlung, die die verringerte Selektivität des Nährbodens kompensiert¹⁵. *C. difficile* wurde aus allen 33 Stuhlproben isoliert, die auf dem Nährboden mit verringertem Cycloserin- und Cephoxitin-Gehalt ausgestrichen wurden. Auf dem Nährboden mit höherer Cycloserin- (500 µg/ml) und Cephoxitin-Konzentration (16 µg/ml) wurden nur aus 25 von 33 Stuhlproben *C. difficile* isoliert. Im Hinblick auf die weite Spanne bei den MHK-Werten der verschiedenen Stämme kann es sinnvoll sein, einen Nährboden mit verringerter Antibiotika-Konzentration einzusetzen. Hierzu kann ein Röhrchen Clostridium-Difficile-Selektiv-Supplement zu einem Liter Clostridium-Difficile-Agar-Basis statt zu 500 ml gegeben werden. Das Untersuchungsmaterial sollte vor dem Beimpfen unbedingt mit Alkohol behandelt werden (siehe Kulturverfahren).

Phillips und Rogers¹⁶ beschrieben eine einfache Modifikation des Nährbodens, bei der die Fähigkeit von *C. difficile* aus p-Hydroxyphenylacetat p-Kresol zu bilden, zur schnellen, vorläufigen Identifizierung mit Hilfe des

gaschromatographischen Nachweises von p-Kresol genutzt wird.

Der Zusatz von 7% Pferdeblut zur Nährboden-Basis erhöht die Wiederauffindung von *C. difficile*. Auch werden im Vergleich zum Nährboden mit Eigelb-Emulsion (George et al.¹¹) größere Kolonien gebildet.

Kulturverfahren

1. Nährboden mittels Öse oder Tupfer mit der Stuhlprobe so beimpfen, daß Einzelkolonien entstehen können.
2. Platten 48 Stunden bei 36°C anaerob bebrüten. Hierzu wird die Verwendung des OXOID Anaerobiertopfes (Art.-Nr. HP 11 bzw. AG 25) in Verbindung mit dem AnaeroGen (Art.-Nr. AN 25 bzw. AN 35) zur Erzeugung einer anaeroben Atmosphäre empfohlen.

Alkoholschock-Behandlung

1. Stuhlprobe mit einem gleichen Teil Ethanol (96%ig oder abs.) versetzen.
2. Mit einem Vortex mischen.
3. Bei Raumtemperatur eine Stunde stehen lassen.
4. Clostridium-Difficile-Selektivnährboden beimpfen und anaerob bebrüten.

Koloniemorphologie

Clostridium difficile

Nach 48stündiger Bebrütung 4-6 mm große, unregelmäßig geformte, sehr weiche Kolonien mit gelapptem Rand, die durch Fructosespaltung und Indikatorumschlag blaßgelb gefärbt sind, aber im UV-Licht bei 360 nm gelbgrün leuchten.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Supplement: 2-8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Clostridium difficile NCTC 11204

Negativkontrolle

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Zusätzliche Hinweise

Die Kolonien von *C. difficile* aus Stuhlproben sind bei Verwendung von Eigelb statt Pferdeblut kleiner.

Da die Zusammensetzung der Clostridium-Difficile-Agar-Basis unter Verwendung mit Pferdeblut konzipiert wurde, enthält sie nicht den Neutralrot-Indikator, der von George et al.¹¹ vorgeschlagen wurde. Außerdem zeigt *C. difficile* auf dem Nährboden mit Neutralrot-Indikator keine Fluoreszenz und bildet nicht die typische Farbe.

Bei Kolonien von Clostridium-Difficile-Selektivnährboden kann die typische Morphologie von *C. difficile* bei der Gramfärbung aufgrund der vorhandenen Antibiotika weniger deutlich ausfallen. Um die charakteristische Morphologie¹¹ zu erhalten, sollte auf Blutagar subkultiviert werden.

Wenn der Nährboden mit halbiertem Antibiotikakonzentration eingesetzt wird, sollte vor dem Beimpfen unbedingt eine Alkoholschockbehandlung durchgeführt werden.

Literatur

1. DGHM (Lieferung 3, 1985) "Verfahrensrichtlinien für die Mikrobiologische Diagnostik". Kap. 1.3, S. 14 und 23.
2. Hall, I. und O'Toole, E. (1935) *Am. J. Dis. Child.* 49, 390.
3. Snyder, M.L. (1940) *J. Infect. Dis.* 66, 1.
4. McBee, R.H. (1960) *J. Bacteriol.* 79, 311.
5. Smith, L.D.S. und King, E.O. (1962) *J. Bacteriol.* 84, 65.
6. Bartlett, J.G. et al. (1977) *J. Infect. Dis.* 136, 701-705.
7. Bartlett, J.G. et al. (1978) *N. Engl. J. Med.* 298, 531-534.
8. George, W.L. et al. (1978) *Lancet* i, 802-803.
9. Keighley, M.R.B. et al. (1978) *Lancet* ii, 1165-1167.
10. Hafiz, S. und Oakley, C.L. (1976) *J. Med. Microbiol.* 9, 129-136.
11. George, W.L. et al. (1976) *J. Clin. Microbiol.* 9, 214-219.
12. Levett, J. (1985) *J. Clin. Pathol.* 38, 233-234.
13. George, W.L. et al. in: Schessinger, D. (Ed.) (1979) "Microbiology". American Society for Microbiology, Washington, D.C., S. 267-271.
14. Dzink, J. und Bartlett, J.G. (1980) *Antimicrob. Ag. Chemother.* 17, 695-698.
15. Borriello, S.P. und Honour, H. (1981) *J. Clin. Pathol.* 34, 1124-1127.
16. Philips, K.D. und Rogers, P.A. (1981) *J. Clin. Pathol.* 33, 643-644.

r