

Mycoplasma-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 401

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Bakteriologisches Pepton	10,0
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	10,0
Natriumchlorid	5,0
Mineralsalze	0,5
Agar	10,0
pH 7,8 ± 0,2	

Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'G'

Art.-Nr. SR 59

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 100 ml)	
Pferdeserum	20 ml
Hefeextrakt (25%, w/v)	10 ml
Thalliumacetat	25 mg
Penicillin	20 000 IE
sehr giftig!	

Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'P'

Art.-Nr. SR 60

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 30 ml)	
Pferdeserum	6 ml
Hefeextrakt (25%, w/v)	3 ml
Thalliumacetat	0,008 g
Glucose	0,3 g
Phenolrot	0,0012 g
Methylenblau	0,0003 g
Penicillin	12 000 IE
Mycoplasma-Bouillon-Basis	0,145 g

Zubereitung

Mycoplasma-Nährboden ohne Selektivzusätze

35,5 g Mycoplasma-Agar-Basis in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Mycoplasma-Selektivnährboden

Anzucht und Isolierung von Mycoplasmen

35,5 g Mycoplasma-Agar-Basis in 1 l Aqua dest. suspendieren, bis zum vollständigen Lösen erhitzen und zu je 80 ml abfüllen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Zu einem Röhrchen **Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'G'** (OXOID, Art.-Nr. SR 59) aseptisch 20 ml steriles Aqua dest. hinzufügen und den Inhalt vorsichtig lösen. Den gelösten Inhalt eines Röhrchens zu 80 ml flüssiger, auf 50°C abgekühlter Mycoplasma-Agar-Basis geben.

Mycoplasma-Selektivnährboden

Zweischichtiger Nährboden zur Anzucht und Isolierung von *Mycoplasma pneumoniae*

35,5 g Mycoplasma-Agar-Basis in 1 l Aqua dest. suspendieren, bis zum vollständigen Lösen erhitzen und jeweils 1 ml in Reagenzröhrchen abfüllen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und Nährboden erstarren lassen.

Zu einem Röhrchen **Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'P'** (OXOID, Art.-Nr. SR 60) aseptisch 20 ml steriles Aqua dest. zufügen und den Inhalt vorsichtig lösen. Jedes Röhrchen mit Mycoplasma-Nährboden mit je 2 ml aufgelöstem Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'P' überschichten.

Die feste Phase kann auch aus Mycoplasma-Selektivnährboden (OXOID, Mycoplasma-Agar-Basis, Art.-Nr. CM 401) mit Zusatz von Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'G' (OXOID, Art.-Nr. SR 59) bestehen.

Beschreibung

Mycoplasma-Agar-Basis ist als Basisnährboden entwickelt worden, dem alle notwendigen Supplemente zum Wachstum von Mycoplasmen (PPLO; Pleuro Pneumonia Like Organisms) zugesetzt werden können.

Edward¹ betonte die Rolle eines toxischen Basisnährbodens für Mycoplasmen. Lynn und Morton² wiesen speziell auf hemmende Faktoren hin, die in Agarchargen vorhanden sein können. Mycoplasma-Agar-Basis enthält nur solche Inhaltsstoffe, die frei von hemmenden oder toxischen Substanzen sind. Sie enthält eine spezielle Mineralsalz-Mischung, die das Wachstum und die Koloniecharakteristika von Mycoplasmen verbessert, ohne die Klarheit des Nährbodens zu stören.

Einige Autoren schlugen vor, den Basisnährboden mit Hefeextrakten^{3,4} oder/und Seren (meist Pferdeserum) zu ergänzen. Da in Seren Antikörper oder Antibiotika vorhanden sein können, ist eine serologische Kontrolle wichtig⁶. In den Mycoplasma-Selektiv-Supplementen 'G' und 'P' ist jeweils Hefeextrakt und Pferdeserum enthalten.

Das Wachstum von Mycoplasmen boviner Herkunft und anderer Mycoplasmen wird nach Edward⁷ durch den Zusatz von Desoxyribonukleinsäure gefördert. Lemcke⁴ empfiehlt deshalb, 20 mg Natriumdesoxyribonukleinsäure je l Nährboden zuzusetzen.

Um das Überwachsen der langsam wachsenden Mycoplasmen durch Kontaminanten zu verhindern, sind zusätzliche antibakterielle Stoffe notwendig. Meist werden Penicillin und Thalliumacetat eingesetzt, T-Stamm Mycoplasmen* sind jedoch Thalliumacetat gegenüber empfindlich. Hutchinson⁵ und Fallon⁶ empfehlen, Thalliumacetat und Penicillin durch Ampicillin (1 mg/ml) zu ersetzen.

Penicillin kann in Konzentrationen von 50-500 IE je ml Nährboden, Thalliumacetat in Konzentrationen von 1/2000 bis 1/8000 eingesetzt werden⁴. Es wird empfo-

len, T-Stamm Mycoplasmen* mit einem Nährboden ohne Thalliumacetat zu isolieren⁸.

Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'G' entspricht der Zusammensetzung nach Hayflick³. Es wird der Mycoplasma-Agar-Basis oder der Mycoplasma-Bouillon-Basis zugesetzt und ergibt mit diesen einen Selektivnährboden für Mycoplasmen des klassischen Typs, die Sterine für ihr Wachstum benötigen. Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'P' ist ein Supplement, das auf der Zusammensetzung basiert, die vom Mycoplasma Reference Laboratory, CPHLS, Colindale, empfohlen wird. In Verbindung mit Mycoplasma-Agar-Basis als feste Schicht wird es zur Zubereitung eines zweischichtigen Nährbodens zur Isolierung und vorläufigen Identifizierung von *Mycoplasma pneumoniae* verwendet.

Viele Mycoplasmen sind aerob oder fakultativ anaerob, einige wachsen allerdings unter mikroaerophilen Bedingungen mit erhöhtem CO₂-Partialdruck; daneben treten auch anaerobe Stämme auf. Pathogene Stämme wachsen bei einer Temperatur von 36°C am besten; saprophytische Stämme dagegen zwischen 22-30°C. T-Stämme* haben ein Temperaturoptimum bei 36°C. Zu ihrer Vermehrung bevorzugen die meisten Mycoplasmen einen pH-Wert von 7,4-8,0; T-Stämme entwickeln sich jedoch am besten bei einem pH-Wert von pH 6,0-6,5. Zur Kultivierung werden Agarplatten oder Flüssignährboden mit Untersuchungsmaterial beimpft und mit Flüssignährboden überschichtet. Die Bebrütung der Agarplatten erfolgt in einer feuchten Kammer unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen oder mikroaerophiler Atmosphäre. Nach sieben Tagen Bebrütung werden die Agarplatten unter einem Plattenmikroskop (60fache Vergrößerung) bei indirektem, durchfallendem Licht beurteilt. Die Kolonien zeigen charakteristische Merkmale: Das Wachstum des Zentrums der Kolonien erfolgt in den Agar hinein, so daß sie 'spiegeleartig' aussehen.

Vor der Identifizierung ist die Reinzüchtung der Mycoplasmen durch weitere Subkultivierung entscheidend. Da Mycoplasmen-Kolonien mit der Ösentechnik schlecht überimpft werden können, sollte ein Stückchen Agar, in dem sich eine Kolonie entwickelt hat, auf weiteren Mycoplasma-Agarplatten ausgestrichen werden. Mit spezifischen Antiseren können Wachstumshemmtests durchgeführt werden^{9,10}.

Zweischichtige Nährböden sollten mit einem Wattetupfer oder einem Sputumfleck beimpft werden und drei Monate lang bei 36°C bebrütet werden. Jedes Röhrchen, das eine intensive Trübung aufgrund Bakterien- oder Pilzwachstums aufweist, sollte verworfen werden.

Zweischichtige Nährböden dienen zur Isolierung und vorläufigen Identifizierung von *Mycoplasma pneumoniae*. In der ersten Wachstumsperiode dieses Mikroorganismus findet eine Reduktion des Methylenblaus statt. Danach führt Säurebildung infolge Glucose-Verwertung zu einem gelben Farbumschlag des Indikators Phenolrot. Kulturen, die einen derartigen Farbumschlag aufweisen, sollten auf Mycoplasma-Agarplatten, supplementiert mit Mycoplasma-Selektiv-Supplement 'G' subkultiviert werden.

*Anmerkung: T-Stamm Mycoplasmen = *Ureaplasma urealyticum*

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Supplemente: 2-8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Mycoplasma pneumoniae ATCC 15531

Negativkontrolle

(mit Thalliumacetat-Zusatz)

Ureaplasma urealyticum ATCC 27618

Zusätzliche Hinweise

Die Mycoplasma-Selektiv-Supplemente 'G' und 'P' enthalten toxisches Thalliumacetat; siehe auch 'Allgemeine Richtlinien zur Verwendung von OXOID Trockennährböden'.

Nährböden mit Thalliumacetat sind nicht zur Isolierung von *Ureaplasma urealyticum* geeignet.

Der **New-York-City-Selektivnährboden** (siehe Neisseria-Gonorrhoeae-Selektivnährboden) fördert auch das Wachstum von Mycoplasma- und Ureaplasma-Spezies. Der transparente hochselektive Nährboden läßt die direkte mikroskopische Untersuchung einer vorläufigen Diagnose auf Mycoplasmen zu. Zum Nachweis von *Ureaplasma urealyticum* (T-Stamm Mycoplasmen) kann auf New-York-City-Selektivnährboden auch Urin untersucht werden.

Literatur

1. Edward, D.G. (1971) Gen. Microbiol. 69, 205-210.
2. Lynn, R.J. und Morton, H.E. (1965) Appl. Microbiol. 4, 339-341.
3. Hayflick, L. (1965) Texas Rep. Biol. & Med. 23, Suppl. 1, 285-303.
4. Lemcke, Ruth M. (1965) "Media for the Mycoplanataceae", Lab. Pract. 14, 712.
5. Hutchinson, D. (1969) J. Med. Lab. Technol. 26, 11-116.
6. Fallon, R.J. (1969) S.A.B. Technical series 3, Academic Press, 41-50.
7. Edward, D.G. (1954) J. Gen. Microbiol. 10, 27-64.
8. Shephard, M. C. und Lanceford, C. D. (1970) Appl. Microbiol. 2, 539-543.
9. Clyde, W. A. (1964) J. Immun. 92, 958-962.
10. Burkhardt, F. (Hrsg.) (1992) "Mikrobiologische Diagnostik" G. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 312.