

Basisnährboden und Supplemente für die Neisserien-Diagnostik

GO-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 367

GO-Agar-Basis enthält Spezialpepton. Die zugesetzte Stärke absorbiert toxische Stoffwechselprodukte der Neisserien. Änderungen des pH-Wertes, z. B. durch Aminbildung, werden durch den Phosphatpuffer minimiert.

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Spezialpepton	15,0
Maisstärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Dikaliumhydrogenphosphat	4,0
Kaliumdihydrogenphosphat	1,0
Agar	10,0
pH 7,2 ± 0,2	

Hämoglobinpulver, löslich

Art.-Nr. LP 53

Ein speziell zubereitetes Hämoglobin, mit dem eine 2%ige (w/v) wässrige Lösung bereitet werden kann, die nach dem Autoklavieren stabil bleibt.

Hefeautolysat-Supplement

Art.-Nr. SR 105

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml)	
Hefeautolysat	5,00 g
Glucose	0,50 g
Natriumbicarbonat	0,075 g

Vitox-Supplement

Art.-Nr. SR 90

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	0,10 mg
L-Glutamin	100,00 mg
Adenin	10,00 mg
Guanin	0,30 mg
p-Aminobenzoesäure	0,13 mg
L-Cystin	11,00 mg
NAD	2,50 mg
Coccarboxylase	1,00 mg
Eisen(III)-nitrat	0,20 mg
Thiamin	0,03 mg
Cystein	259,00 mg
Glucose	1,00 g

Vitox-Lösungsmittel

(wird zusammen mit Vitox-Supplement, OXOID Art.-Nr. SR 90 geliefert)

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je Röhrchen Vitox)

Glucose	1,00 g
Aqua dest.	10,00 ml

Vitox kann zufriedenstellend mit einer Endkonzentration von 1% (v/v) im Nährboden (1 Röhrchen je 1000 ml) eingesetzt werden. Nach den Ergebnissen in den OXOID Laboratorien führt eine Erhöhung der Konzentration auf 2% (v/v, 1 Röhrchen je 500 ml) zum Thayer-Martin-Nährboden zu einem schnelleren Wachstum von *Neisseria gonorrhoeae*.

VCN-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 101

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Vancomycin	1,50 mg
Colistin	3,75 mg
Nystatin	6 250 IE

Thayer und Martin³ beschrieben einen Nährboden, zu dem die obigen Antibiotika zugesetzt wurden. Dieser Selektivnährboden für Gonokokken und Meningokokken wurde weitgehend anerkannt zur Primärisolierung dieser Keime von auffallend kontaminierten Stellen.

Zusammensetzung der OXOID Supplemente zur Isolierung von Neisserien

Bestandteile je 1 Nährboden	Hefeautolysat- Supplement (SR 105)	Vitox- Supplement (SR 90)	VCN-Selektiv- Supplement (SR 101)	VCNT-Selektiv- Supplement (SR 91)	LCAT-Selektiv- Supplement (SR 95)	VCAT-Selektiv- Supplement (SR 104)
	mit Lösungsmittel					
Hefeautolysat	10,00 g	–	–	–	–	–
Glucose	1,00 g	4,00 g	–	–	–	–
Natriumbicarbonat	0,150 g	–	–	–	–	–
Cynocobalamin (Vitamin B ₁₂)	–	0,20 mg	–	–	–	–
L-Glutamin	–	200,00 mg	–	–	–	–
Adenin	–	20,00 mg	–	–	–	–
Guanin	–	0,60 mg	–	–	–	–
p-Aminobenzoensäure	–	0,26 mg	–	–	–	–
L-Cystin	–	22,00 mg	–	–	–	–
NAD	–	5,00 mg	–	–	–	–
Coccarboxylase	–	2,00 mg	–	–	–	–
Eisen(III)-nitrat	–	0,40 mg	–	–	–	–
Thiamin	–	0,06 mg	–	–	–	–
Cystein	–	518,00 mg	–	–	–	–
Vancomycin	–	–	3,00 mg	3,00 mg	–	2,00 mg
Colistin	–	–	7,50 mg	7,50 mg	6,00 mg	7,50 mg
Nystatin	–	–	12 500 IE	12 500 IE	–	–
Trimethoprim	–	–	–	5,00 mg	6,50 mg	3,00 mg
Lincomycin	–	–	–	–	1,00 mg	–
Amphotericin B	–	–	–	–	1,00 mg	1,00 mg

VCNT-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 91

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Vancomycin	1,50 mg
Colistin	3,75 mg
Nystatin	6 250 IE
Trimethoprim	2,50 mg

Seth⁴ beschrieb eine Modifikation des Thayer-Martin-Nährbodens, bei der Trimethoprim (5 µg/ml) zusätzlich zu den VCN-Antibiotika zugesetzt wurde. Mit diesem Supplement wird vor allem das Schwärmen von *Proteus* spp. unterdrückt. Einige andere Autoren⁵⁻⁷ bestätigten die wachstumsfördernde Wirkung für *N. gonorrhoeae* und die Schwärmhemmung von *Proteus* spp.

LCAT-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 95

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Lincomycin	0,50 mg
Colistin	3,00 mg
Amphotericin B	0,50 mg
Trimethoprim	3,25 mg

Young⁸ beschrieb eine Modifikation des New-York-City-Nährbodens, dem die obigen Antibiotika zugesetzt wurden. Dabei wirkt Lincomycin in einer Konzentration von 3 µg/ml weniger hemmend auf Gonokokken als Vancomycin^{9,10}. Nystatin wurde durch Amphotericin B ersetzt, das sich als stärkeres Fungizid bei der Unterdrückung von kontaminierenden Hefen erwies¹¹.

VCAT-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 104

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Vancomycin	1,00 mg
Colistin	3,75 mg
Amphotericin B	0,50 mg
Trimethoprim	1,50 mg

Faur und Mitarbeiter¹² beschrieben einen Nährboden, in dem Nystatin durch Amphotericin B ersetzt wurde, das sich als stärkeres Fungizid bei der Unterdrückung der meisten Hefekontaminanten erwiesen hatte. Der Gehalt an Vancomycin wurde von 3 µg/ml auf 2 µg/ml reduziert, um die von Ryan⁹ beschriebenen 3% aller Gonokokken-Stämme nicht zu hemmen, die auf einen Gehalt von 3 µg/ml Vancomycin empfindlich reagieren¹¹.

Nährböden

Zubereitung der verschiedenen Selektivnährböden

New-York-City-Selektivnährböden

1. 18 g GO-Agar-Basis in 425 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.
2. 50 ml defibriniertes Pferdeblut (OXOID, Art.-Nr. SR 50) mit 0,5% (v/v) Saponin lysieren.
3. Den Inhalt eines Röhrchens Hefeautolysat-Supplement in 15 ml sterilem Aqua dest. aseptisch lösen.
4. Den Inhalt eines Röhrchens LCAT- oder VCAT-Selektiv-Supplement aseptisch in 10 ml Aqua dest. lösen.
5. Aseptisch das lysierte Pferdeblut, das gelöste Hefeautolysat-Supplement sowie das gelöste LCAT- bzw. VCAT-Selektiv-Supplement zu 425 ml steriler, auf 50°C abgekühlter GO-Agar-Basis zusetzen. Vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen mischen und Platten gießen.

Dies ist eine Variante des New-York-City-Nährbodens¹¹⁻¹³, die auf einer Veröffentlichung von Young¹⁴ basiert. Der ursprünglich empfohlene höhere Glucose-Gehalt wurde reduziert, um die Durchführung von Zuckerverwertungstests zu ermöglichen¹⁵.

Thayer-Martin-Selektivnährböden mit Vitox-Supplement und VCN-Selektiv-Supplement bzw. VCNT-Selektiv-Supplement

1. 18 g GO-Agar-Basis in 240 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.
2. Eine 2%ige Hämoglobin-Lösung herstellen, indem 5 g Hämoglobinpulver (OXOID, Art.-Nr. LP 53) in 250 ml warmem Aqua dest. gelöst werden. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.
3. Den Inhalt eines Röhrchens Vitox-Supplement wie auf dem Etikett beschrieben aseptisch lösen.

Kohlenhydratverwertung einiger humaner Neisserien-Arten (nach Burkhardt¹⁶)

Keim	Glucose	Maltose	Lactose	Saccharose
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-
<i>N. flava</i> und verwandte Keime	+	+	-	+/-
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	-
<i>Branhamella catarrhalis</i>	-	-	-	-

+ : Säurebildung; - : keine Verwertung; +/- : variierende Reaktionen bei unterschiedlichen Typen. Lagerung und Haltbarkeit

Bestandteile der verschiedenen Neisseria-Nährböden

Nährboden	Bestandteile			
	Basisnährboden	Hämoglobin oder Blut	Wachstums-Supplement	Selektiv-Supplement
Thayer-Martin-Nährboden (nicht selektiv)	GO-Agar-Basis	Hämoglobinpulver	Vitox-Supplement	-
Thayer-Martin-Selektivnährboden (Vitox, VCN)	GO-Agar-Basis	Hämoglobinpulver	Vitox-Supplement	VCN-Selektiv-Supplement
Thayer-Martin-Selektivnährboden, mod. (Vitox, VCNT)	GO-Agar-Basis	Hämoglobinpulver	Vitox-Supplement	VCNT-Selektiv-Supplement
„Transgrow“-Nährboden	GO-Agar-Basis + 1% Agar Nr. 1	Hämoglobinpulver	Vitox-Supplement	VCN- oder VCNT-Selektiv-Supplement
New-York-City-Selektivnährböden	GO-Agar-Basis	Lysiertes Pferdeblut	Hefeautolysat-Supplement	LCAT- oder VCAT-Selektiv-Supplement

- Den Inhalt eines Röhrchens VCN-Selektiv-Supplement oder den Inhalt eines Röhrchens VCNT-Selektiv-Supplement wie auf dem Etikett beschrieben aseptisch lösen.
- Die Vitox-Lösung aseptisch zu 240 ml steriler, auf 50°C abgekühlter GO-Agar-Basis geben.
- Das gelöste VCN- oder VCNT-Selektiv-Supplement ebenfalls aseptisch zusetzen.
- Aseptisch 250 ml sterile, auf 50°C abgekühlte Hämoglobin-Lösung zugeben. Vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen mischen und Platten gießen.

“Transgrow“-Selektivnährboden

“Transgrow“-Selektivnährboden wie die beschriebenen Thayer-Martin-Selektivnährböden zubereiten. Dem Basisnährboden ist vor dem Autoklavieren zusätzlich 1% Agar Nr. 1, neutral (OXOID, Art.-Nr. LP 11) zuzufügen. Den Nährboden in Röhrchen als Schrägagar erstarren lassen. Die für diesen Nährboden sonst zusätzlich erforderliche Glucose ist in den Wachstumssupplementen enthalten.

Kulturverfahren

- Den Nährboden wie beschrieben zubereiten.
- Den Tupfer mit Kulturmaterial über ein Segment der feuchten Platte oder besser in Form eines großen “Z” rollen, so daß eine ausreichende Fläche der Platte beimpft wird. Mit einer sterilen Impföse auf der Platte ausstreichen, um eine adäquate Verteilung des Keims zu bekommen.
- Platten bei 36°C in einem versiegeltem Glas mit mindestens 70% Luftfeuchtigkeit und 5–10% CO₂ bebrüten. Die genannten Inkubationsbedingungen können durch die Verwendung des OXOID CO₂Gen (Art.-Nr. CD 25) im OXOID Anaerobiertopf (Art.-Nr. AG 25) erreicht werden.
- Platten nach 24 Stunden Bebrütung begutachten und bei negativem Befund weitere 24 Stunden bebrüten.
- Verdächtige Gonokokken-Kolonien durch Gramfärbung, Oxidase-Reaktion und Zuckerverwertungs-Tests identifizieren.

Typische Reaktionen von *N. gonorrhoeae*

Gramnegative Kokken, meist an der Längsachse parallel zusammenhängend (Semmelform), Oxidase-positiv.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden und Hämoglobinpulver:
Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10–25°C.
Supplemente: 2–8°C.
Pferdeblut, lysiert: –20° bis +8°C.
Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

(mit Antibiotika-Zusatz)

Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424

Neisseria meningitidis ATCC 13090

(ohne Antibiotika-Zusatz)

Haemophilus influenzae ATCC 35036

Negativkontrolle

(mit Antibiotika-Zusatz)

Proteus vulgaris ATCC 13315

Staphylococcus aureus ATCC 25923

(ohne Antibiotika-Zusatz)
unbeimpfter Nährboden

Zusätzliche Hinweise

Für die Abstrichentnahme werden Dacron- oder Calciumalginate-Tupfer empfohlen.

Jedes Untersuchungsgut mit Verdacht auf Neisserien sollte sofort nach Abstrichentnahme auf Nährböden zur Primärisolierung aufgebracht werden. Falls dies nicht möglich ist, sollte Untersuchungsmaterial mit Verdacht auf *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* in einem Transportnährboden (z. B. “Transgrow“- oder Stuart-Transportnährboden, OXOID Art.-Nr. CM 111) auf dem schnellsten Wege transportiert werden.

Hosty et al.¹⁷ zeigten, daß die normalen Transportnährböden für *Neisseria gonorrhoeae* nicht völlig verlässlich sind. Ihrer Meinung nach sollte die Oberfläche eines Schrägagars in Flaschen mit dem Untersuchungsmaterial beimpft werden.

Eine parallele Bebrütung von GO-Nährböden mit und ohne Antibiotika ist zu empfehlen, weil einige Neisserien-Stämme u. U. in Gegenwart von Antibiotika, besonders von Vancomycin¹⁸, schlecht wachsen könnten.

Feuchtigkeit ist zur erfolgreichen Isolierung von Gonokokken essentiell. Falls die zubereiteten Platten trocken aussehen, sollte die Oberfläche mit einigen Tropfen steriler Nährbouillon angefeuchtet werden; die vor der Beimpfung in den Agar eingezogen sein sollten. Vor der Bebrütung feuchte Gaze oder Papiertücher in den Anaerobiertopf legen.

Es ist bekannt, daß Agar hinsichtlich der Toxizität für *N. gonorrhoeae* sehr unterschiedlich sein kann. Das kann eine wesentliche Ursache für ein schlechtes Wachstum von Gonokokken auf dem festen Nährboden sein¹⁹.

Grammorphologie, Koloniemorphologie und der Oxidase-Test bilden die Basis für die vorläufige Identifizierung der Gattung *Neisseria*. Alle präsumtiven Neisserien sollten durch Kohlenhydratverwertung-Tests und fluoreszenzmarkierte Antikörper (FAT) o. a. serologische Nachweise bestätigt werden²⁰. Ein ONPG-Test weist Lactose-positive *Neisseria*-Stämme, z. B. *N. lactamica*, nach²¹.

OXOID Produkte zur Anzucht und Identifizierung von *Neisseria* spp.

Bezeichnung	Art.-Nr.
GO-Agar-Basis	CM 367
Agar Nr. 1	LP 11
Hämoglobinpulver, löslich	LP 53
Hefeautolysat-Supplement	SR 105
Vitox-Supplement	SR 90
Defibriniertes Pferdeblut	SR 50
Lysiertes Pferdeblut	SR 48
VCN-Selektiv-Supplement	SR 101
VCNT-Selektiv-Supplement	SR 91
LCAT-Selektiv-Supplement	SR 95
VCAT-Selektiv-Supplement	SR 104
Beta-Lactamase-Teststäbchen	BR 66
Oxidase-Teststäbchen	BR 64
Anaerobiertopf	AG 25
CO ₂ Gen	CD 25

Literatur

1. Willcox, R.R. (1979) Euro Reports and Studies. 12, WHO Regional Office for Europe, Kopenhagen.
2. WHO (1978) "Neisseria gonorrhoeae and gonococcus infections". Report of a WHO Group, Technical Report Series 616, WHO.
3. Thayer, J.D. und Martin, J.E. (1966) Public Health Reports 81 (6), 559-562.
4. Seth, A. (1970) Brit. J. Vener. Dis. 46, 201-202.
5. Riddel, R.H. und Buck, A.C. (1970) J. Clin. Pathol. 23, 481-483.
6. Odegaard, K. (1971) Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 79, 545-548.
7. Martin, J.E. und Lester, A. (1971) HSMHA Health Reports 86, Nr. 1, 30-33.
8. Young, H. (1978) Brit. J. Vener. Dis. 54, 36-40.
9. Reyn, A. und Bentzon, M.W. (1972) Brit. J. Vener. Dis. 48, 363-368.
10. Mirrett, S., Reller, L.B. und Knapp, J.S. (1981) J. Clin. Microbiol. 14, 94-96.
11. Faur, Y.C. et al. (1973) Health Lab. Sci. 10, 44-54.
12. Faur, Y.C., Weisburd, M.H. und Wilson, M.E. (1973) Health Lab. Sci. 10, 55-60.
13. Faur, Y.C., Weisburd, M.H. und Wilson, M.E. (1977) Health Lab. Sci. 15, 22-27.
14. Young, H. (1978) Brit. J. Vener. Diseases. 54, 36-40.
15. Young, H. (1978) J. Clin. Microbiol. 7, 247-250.
16. Burkhardt, F. (Hrsg.) (1992) "Mikrobiologische Diagnostik". G. Thieme Verlag, Stuttgart, 75-85.
17. Hosty, T. et al. (1974) Am. J. Clin. Pathol. 62, 435-438.
18. Faur, Y.C., Weisburd, M.H. und Wilson, M.E. (1978) Health Lab. Sci. 15, 22-26.
19. Jones, R.T. und Talley, R.S. (1977) J. Clin. Microbiol. 5, 9-13.
20. CDC (1975) "General information to aid in handling Neisseria gonorrhoeae specimens in the laboratory". US DHEW Centre for Disease Control, Atlanta.
21. Hollis D. G., Wiggins G. T. und Weaver R. E. (1969) Appl. Microbiol. 17, 71-77.