

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährböden

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden
NAV-Selektivnährboden
NAT-Selektivnährboden
Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Lösung

Zur Kultivierung und antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung von Anaerobiern nach der Agar-Dilutionsmethode bzw. Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode nach DIN 58944¹.

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden-Basis

Art.-Nr. CM 619

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Caseinpepton	10,0
Gelatinepepton	10,0
Hefeextrakt	5,0
Glucose	1,0
Natriumchlorid	5,0
L-Arginin	1,0
Natriumpyruvat	1,0
Menadion (Vitamin K ₃)	0,0005
Hämin	0,005
Agar	10,0
pH 7,1 ± 0,2	

Zubereitung

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden

43 g Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden in 1 l Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren.

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden mit Blutzusatz

500 ml Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden wie oben zubereiten, autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Aseptisch 5-10% defibriniertes Schaf- oder Pferdeblut (OXOID, Art.-Nr. SR 51 bzw. SR 50) zusetzen, gut mischen und Platten gießen.

NAV-Selektivnährboden

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden mit G-N-Anaerobier-Selektiv-Supplement und Blut-Zusatz zur Isolierung gramnegativer Anaerobier.

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden-Basis

Art.-Nr. CM 619

G-N-Anaerobier-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 108

Zusammensetzung je Röhrrchen

(1 Röhrrchen je 500 ml)

Hämin	2,5 mg
Menadion (Vitamin K ₃)	0,25 mg
Natriumsuccinat	1,25 mg
Nalidixinsäure	5,0 mg
Vancomycin	1,25 mg

Zubereitung

500 ml Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden wie oben zubereiten, autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Den Inhalt eines Röhrrchens G-N-Anaerobier-Selektiv-Supplement aseptisch in 10 ml sterilem Aqua dest. lösen. Das gelöste Supplement sowie 5-10% defibriniertes Schaf- oder Pferdeblut (OXOID, Art.-Nr. SR 51 bzw. SR 50) zusetzen, gut mischen und Platten gießen.

NAT-Selektivnährboden

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden mit N-S-Anaerobier-Selektiv-Supplement sowie Blut- und "Tween" 80-Zusatz. Zur Isolierung nichtsporenbildender Anaerobier.

Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden-Basis

Art.-Nr. CM 619

N-S-Anaerobier-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 107

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Hämin	2,5 mg
Menadion (Vitamin K ₃)	0,25 mg
Natriumpyruvat	500 mg
Nalidixinsäure	5,0 mg

Zubereitung

500 ml Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden wie oben zubereiten, 0,5 ml "Tween" 80 zusetzen, autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Den Inhalt eines Röhrchens N-S-Anaerobier-Selektiv-Supplement aseptisch in 10 ml sterilem Aqua dest. lösen. Das gelöste Supplement sowie 5–10% defibriniertes Schaf- oder Pferdeblut (OXOID, Art.-Nr. SR 51 bzw. SR 50) zusetzen, gut mischen und Platten gießen.

Beschreibung

Die Frage nach der Verfügbarkeit eines Standardnährbodens für die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung von Anaerobiern veranlaßten Wilkins und Chalgren² zur Entwicklung eines Nährbodens ohne Blutzusatz. Sie setzten im Nährboden Hefeextrakt ein, der Vitamine und Wachstumsfaktoren wie Purine und Pyrimidine für eine verbesserte Anzucht von *Peptostreptococcus anaerobius* und *Bacteroides melaninogenicus* enthält. Arginin wurde wegen des Wachstums von *Eubacterium lentum*, Natriumpyruvat als Energiequelle für asaccharolytische Kokken wie *Veillonella* spp.³ in die Rezeptur aufgenommen. Natriumpyruvat reagiert analog der Katalase und zersetzt Spuren von Peroxiden, die durch Einwirkung von Sauerstoff auf Bestandteile des Nährbodens vorhanden sein und den Metabolismus von Anaerobiern beeinflussen könnten⁴. Hämin ist für das Wachstum von *Bacteroides* spp.⁵ und Menadion für das von *B. melaninogenicus*⁶ essentiell. Casein- und Gelatinepeptone werden verwendet, um eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen. Wilkins und Chalgren² entwickelten somit einen Nährboden, auf dem Anaerobier ebensogut oder besser als auf Brucella- oder Schaedler-Blutagar wachsen.

Eine vergleichende Untersuchung in zehn Laboratorien ergab, daß der Nährboden zur antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung mit der Agardilutionsmethode verwendet werden kann. Der Wert dieser Referenzmethode wurde von Brown und Waatti hervorgehoben⁷, die über eine zunehmende Resistenz anaerober Keime gegen häufig verwendete Antibiotika berichteten.

Der Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden kann aber auch, insbesondere mit Blutzusatz als universeller Nährboden für die Anzucht von Anaerobiern empfohlen werden.

Der **NAT-Nährboden** (Wilkins-Chalgren-Nährboden mit "Tween" 80 sowie N-S-Anaerobier-Selektiv-Supplement) wird für die Isolierung nichtsporenbildender Anaerobier aus klinischem Material empfohlen⁸. Die Isolierung nichtsporenbildender Keime aus einer gemischten Flora ist oft

schwierig. Der NAT-Selektivnährboden mit Nalidixinsäure als selektivem Agens wurde von Wren beschrieben⁸. Der Nährboden ist besonders für den Nachweis grampositiver Keime wertvoll, deren Wachstum von "Tween" 80 gefördert wird⁹. Ein weiterer Vorteil des NAT-Selektivnährbodens ist die frühe Koloniepigmentierung von *B. melaninogenicus* infolge der verlangsamten Lyse der Blutzellen während der Inkubation durch "Tween" 80. Der NAT-Selektivnährboden ist in der Regel auch weniger hemmend für nichtsporenbildende Anaerobier als aminoglycosidhaltige Nährböden¹⁰. Das N-S-Anaerobier-Selektiv-Supplement enthält neben Nalidixinsäure als selektivem Agens Hämin, Menadion und Natriumpyruvat als Wachstumsfaktoren bzw. Energiequelle^{3-6, 8}. Downes et al.¹¹ beschrieben, daß der NAT-Selektivnährboden für den Nachweis von Anaerobiern (außer Clostridien) leistungsfähiger als Kanamycin- und Neomycin-Agar war, insbesondere für grampositive Anaerobier.

Der **NAV-Selektivnährboden** (Wilkins-Chalgren-Nährboden mit G-N-Anaerobier-Selektiv-Supplement) für die Isolierung gramnegativer Anaerobier¹² ist eine Modifikation des NAT-Selektivnährbodens, in der "Tween" 80 und Natriumpyruvat durch Natriumsuccinat ersetzt und dem Vancomycin als selektives Agens für gramnegative Anaerobier zugesetzt wurde. Damit enthält das G-N-Anaerobier-Selektiv-Supplement Nalidixinsäure und Vancomycin als selektive Agenzien und Hämin, Menadion und Natriumsuccinat als Wachstumsfaktoren bzw. Energiequelle^{5, 6, 13}. Die Isolierung gramnegativer Anaerobier mit NAV-Selektivnährboden ist erfolgreicher als mit Nährböden, die Neomycin oder Kanamycin als selektive Agenzien enthalten¹¹.

Um eine optimale Isolierung nichtsporenbildender Anaerobier aus klinischem Material zu erreichen, sollte Wilkins-Chalgren-Nährboden mit Blutzusatz parallel zu NAT- und NAV-Selektivnährboden beimpft werden.

Kulturverfahren

1. Möglichst frisch gegossene Platten verwenden.
2. Platten beimpfen und 48 Stunden bei 36°C anaerob bebrüten.
Die anaeroben Bedingungen können am besten mit dem OXOID AnaeroGen (Art.-Nr. AN 25 bzw. AN 35) im Anaerobiertopf (OXOID, Art.-Nr. AG 25 bzw. HP 11) erreicht werden.
3. Platten auswerten. Wird kein Wachstum beobachtet, Platten bis zu 5 Tagen bebrüten, da ca. 20% der nichtsporenbildenden Keime längere Bebrütungszeiten unter streng anaeroben Bedingungen erfordern.
4. In positiven Fällen Bestätigungstests durchführen.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10–25°C.

Selektiv-Supplemente: 2–8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Wilkins-Chalgren-Nährboden mit und ohne Blutzusatz
Positivkontrolle

Clostridium perfringens ATCC 13124

Bacteroides fragilis ATCC 25285

Negativkontrolle
unbeimpfter Nährboden

NAT-Selektivnährboden

Positivkontrolle
Bacteroides melaninogenicus ATCC 15930
Peptococcus magnus ATCC 14956

Negativkontrolle
Escherichia coli ATCC 25922

NAV-Selektivnährboden

Positivkontrolle
Bacteroides fragilis ATCC 25285
Fusobacterium necrophorum ATCC 25286

Negativkontrolle
Escherichia coli ATCC 25922

Literatur

1. DIN 58944: "Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung anaerober bakterieller Krankheitserreger gegen Chemotherapeutika. Agar-Dilutionsmethode und Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode."
2. Wilkins, T.D. und Chalgren, S. (1976) Antimicrob. Agents Chemother. 10, 926-928.
3. Rogosa, M. (1964) J. Bacteriol. 87, 162-170
4. Hoffman, P.S. et al. (1979) Can. J. Microbiol. 25, 8-16.
5. Quinto, G. und Sebald, M. (1964) Am. J. Med. Technol. 30, 381-384.
6. Gibbons, R.J. und MacDonald, J.B. (1960) J. Bacteriol. 80, 164-170.
7. Brown, W.J. und Waatti, P.E. (1980) Antimicrob. Agents Chemother. 17, 629-635.
8. Wren, M.W.D. (1977) J. Med. Microbiol. 10, 195-201.
9. Holdeman, L.V. und Moore, W.E.C. (1977) "Anaerobe laboratory manual". 4th Ed.
10. Wren, M.W.D. (1980) J. Clin. Pathol. 33, 61-65.
11. Downes, J., Stern, L. und Andrew, J.H. (1986) Pathology 18, 141-144.
12. Wren, M.D.W. (1981) Pers. Mitteilung.
13. Lev, M., Keudell, K.C. und Milford, A.F. (1971) J. Bacteriol. 108, 175-178.