

## BD Tryptic Soy Agar

### VERWENDUNGSZWECK

**BD Tryptic Soy Agar** (BD Tryptic-Soja-Agar), erhältlich in Flaschen, ist ein halbfertiges Universal-Medium, das nach dem Ausgießen in eine Petrischale oder ein Röhrchen das Wachstum von nicht anspruchsvollen und mäßig anspruchsvollen Mikroorganismen unterstützt. In der klinischen Mikrobiologie wird es nicht zur Isolierung von Erregern aus klinischen Proben verwendet, kann jedoch zur Kultivierung von Bakterienstämmen benutzt werden. Nach Zusatz von Blut kann es als Erstisolierungsmedium in der klinischen Mikrobiologie verwendet werden.

### GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

Durch seine Nährstoffzusammensetzung ist Tryptic-Soja-Agar ein seit vielen Jahren beliebtes Medium. Im Arzneimittelbuch der USA (United States Pharmacopeia) und der Europäischen Pharmakopöe wird dieses Medium als Casein-Soja-Pepton-Agar-Medium für den gesamten aeroben Bestimmungsanteil im Rahmen des mikrobiellen Grenzwert-Testverfahrens beschrieben.<sup>1,2</sup> Das vorbereitete Medium wird für verschiedene Zwecke verwendet, einschließlich der Erhaltung von Stammkulturen, Plattenzählungen und der Isolierung von Mikroorganismen aus einer Vielzahl von Materialien.<sup>3-5</sup> Es steht auch in den Kompendien für die Untersuchungsmethoden von Wasser, Abwasser und Nahrungsmitteln.<sup>6,7</sup>

Die Verwendung dieses Mediums in der klinischen Mikrobiologie ist beschränkt, da es das Wachstum einer Vielzahl von anspruchsvollen Bakterien unterstützt. Da Tryptic-Soja-Agar jedoch die Wachstumsfaktoren X und V nicht enthält, eignet es sich für die Bestimmung des Bedarfes an diesen Wachstumsfaktoren von Isolaten der *Haemophilus*-Spezies durch die Zugabe von Streifen mit Faktor X, V und XV zu inokulierten TSA-Platten.<sup>8</sup> BD Tryptic Soy Agar kann ebenfalls als Medium zur Erhaltung oder Subkultivierung von Referenzstämmen, z.B. *Enterobacteriaceae* und Staphylokokken, verwendet werden. Das unergänzte Medium wird nicht als Erstisolierungsmedium für klinische Anwendungen verwendet. Nach der Zugabe von Blut (z.B. 5 % Schafblut) kann es zur Isolierung von Bakterien aus klinischen Proben benutzt werden.<sup>9,10</sup>

Die Kombination von Casein- und Soja-Peptonen in **BD Tryptic Soy Agar** liefert organischen Stickstoff, insbesondere Aminosäuren und langkettige Peptide, und macht so das Medium nährstoffreich. Natriumchlorid wahrt das osmotische Gleichgewicht. **BD Tryptic Soy Agar** (Flaschenmedien) sind halbfertige Medien in Flaschen, aus welchen der Anwender Platten- oder Röhrchenmedien zubereiten kann. Diese Medien werden aus dem **Difco** Trockennährboden hergestellt.

### REAGENZIEN

#### BD Tryptic Soy Agar

Zusammensetzung\* pro Liter destilliertem Wasser

<b>Bacto</b> Trypton (Pankreatisch abgebautes Casein)	15,0 g
<b>Bacto</b> Soyton (papainisch abgebautes Sojabohnenmehl)	5,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	15,0

pH 7,3 ± 0,2

\*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

### VORSICHTSMASSNAHMEN

**IVD** . Nur für den professionellen Gebrauch.

Flaschen bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden. Zur Vervollständigung dieses halbfertigen Flaschenmediums sind die unter **VERFAHREN – Vorbereitung der Reagenzien** beschriebenen Verfahren zu befolgen und die Warnungen zu beachten. Hinweise zu Verfahren aseptischer Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des gebrauchten Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

### LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Flaschen nach Erhalt bei 5 – 25 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder überhitzen. Das Medium kann bis zum Verfallsdatum verwendet und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden. Flaschen aus geöffneten Packungen können bis zum Verfallsdatum verwendet werden. Offene Flaschen sind sofort zu verwenden. Um aus dem Flaschenmedium Platten oder Röhrrchen zuzubereiten, muss das Medium zuerst verflüssigt werden (siehe **VERFAHREN – Vorbereitung der Reagenzien**). Medium nach dem Erstarren nicht mehr als einmal verflüssigen.

### QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Unangereichertes Medium: Aus dem halbfertigen Medium Platten oder Röhrrchen zubereiten (siehe **VERFAHREN – Vorbereitung der Reagenzien**), ohne Zusätze, wie z.B. Blut, hinzuzufügen. Platten oder Röhrrchen mit den in der untenstehenden Tabelle aufgeführten Teststämmen inokulieren. Für weitere Einzelheiten ist die **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG** zu beachten. Die Bakterien 18 – 24 h bei 35 ± 2 °C aerob inkubieren. *Aspergillus niger* 3 – 4 Tage bei 25 – 28 °C aerob inkubieren. Gemäß USP und EP sollte das Medium bei 30 – 35 °C inkubiert werden.<sup>1,2</sup>

Stämme	Ergebnisse
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Wachstum
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Wachstum
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Wachstum
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Wachstum
Nicht inokuliert	Hell bernsteinfarben bis bernsteinfarben, leicht opaleszierend

Medium ergänzt mit 5 % defibriniertem Schafblut: Aus dem halbfertigen Medium Platten zubereiten (siehe **VERFAHREN – Vorbereitung der Reagenzien**) und nach der Abkühlung auf 48 – 50 °C mit 5 % Schafblut ergänzen. Es wird empfohlen, das angereicherte Medium gemäss NCCLS-Standard M22-A2 zu testen.<sup>11</sup> Stämme 20 – 24 h in einer mit Kohlendioxid angereicherten aeroben Atmosphäre inkubieren.

Stämme	Ergebnisse
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Wachstum, Beta-Hämolyse
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Wachstum, Alpha-Hämolyse
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Wachstum; mit oder ohne Beta-Hämolyse
Nicht inokuliert	Rot (blutfarben)

### VERFAHREN

#### Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

**BD Tryptic Soy Agar** (halbfertiges Flaschenmedium). Siehe **LIEFEBARE PRODUKTE** für Füllmengen und Packungsgrößen.



#### Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Autoklav (auf 100 ± 2 °C eingestellt); Dampfkocher oder Heizplatte; Wasserbad (48 – 50 °C); defibriniertes Blut (nur zur Zubereitung von Blutplatten); sterile Glasbehälter und sterile Plastik-Petrischalen bzw. Röhrrchen.

Zusätzliche Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

## **Vorbereitung der Reagenzien**

**BD Tryptic Soy Agar** (Flaschenmedien) durch Erhitzen in einem Autoklaven oder Dampfkocher verflüssigen. Alternativ kann die Flasche auch in einen mit Wasser gefüllten Topf gestellt werden, welcher auf eine Heizplatte gestellt und zum Kochen gebracht wird. **Vor dem Erhitzen Verschluss leicht lösen, um einen Druckausgleich zu ermöglichen.**

**Warnung: Die Verwendung von Mikrowellengeräten zur Verflüssigung dieses Mediums wird nicht empfohlen. Medienflaschen mit Metallverschlüssen nicht in ein Mikrowellengerät stellen.**

Bei Verwendung eines Autoklaven sollte die Temperatur nicht mehr als  $100 \pm 2$  °C betragen, da übermäßiges Erhitzen die Bestandteile zersetzen kann, was unter Umständen zu einer unzureichenden mikrobiologischen Leistung führen kann. Wenn eine Heizplatte und/oder ein Wasserbad verwendet wird, Wasser so lange kochen, bis das Medium vollständig gelöst ist. Der benötigte Zeitraum bis zur vollständigen Verflüssigung des Mediums kann erheblich variieren und hängt von der eigentlichen Temperatur des Heizgerätes vor der Anwendung, von dessen Wattleistung und Größe ab, sowie von Volumen und Temperatur des Mediums im Behälter. Es wird empfohlen, einen Testlauf durchzuführen und die benötigte Zeit bis zur Verflüssigung nach der ersten Anwendung zu notieren.

Nach der vollständigen Verflüssigung wird der Behälter aus dem Heizgerät genommen und in ein Wasserbad von 48 – 50 °C gestellt.

**Warnung: Hitzeschutzhandschuhe tragen. Den heißen Behälter nicht zur schnelleren Abkühlung in ein Eisbad oder in kaltes Wasser stellen, da dies zu Rissen im Glas führen könnte. Verbrühungsgefahr!**

Den Behälter lange genug im Wasserbad belassen, bis das gesamte Medium auf die eingestellte Temperatur abgekühlt ist.

Wenn defibriertes Blut (z.B. 5 % Schafblut) oder andere hitzeempfindliche Zusätze (welche vor der Anwendung Raumtemperatur aufweisen müssen) beigefügt werden, darf die Temperatur des Mediums 50 °C nicht übersteigen. Bei der Zugabe der Zusätze und während des Ausgießens der Platten sind aseptische Bedingungen einzuhalten! Sterile Petrischalen oder Röhrchen verwenden. Medium nach der Zugabe des Zusatzes sorgfältig mischen und dabei die Bildung von Schaum und Luftblasen vermeiden.

Medium in die Petrischalen gießen, falls eine Oberflächeninokulierung erwünscht ist. Für eine normale 90 – 100 mm-Petrischale sind 19 – 21 mL ausreichend. Das ergänzte Medium erstarren lassen, die Platten umdrehen und bei Raumtemperatur hinreichend lange trocknen lassen (zur vollständigen Erstarrung Platten über Nacht bei 18 – 23 °C lagern). Platten in frische Plastikbeutel geben und bei 2 – 8 °C aufbewahren. Die vorbereiteten Platten mit diesem Medium können während 5 – 7 Tagen verwendet werden.

Wenn das Plattengussverfahren zu Anwendung kommen soll, das zu testende Material oder seine Verdünnung in die leere Petrischale geben und mit dem Medium bedecken. Petrischale leicht rotieren, um das Material zu mischen, und danach vollständig erstarren lassen.

Für die Zubereitung von Schrägagar in Röhrchen die geeignete Menge des verflüssigten, auf 48 – 50 °C abgekühlten Mediums in die Röhrchen geben und in der gewünschten Schräglage erstarren lassen. Mit Schraubverschlüssen fest verschlossen und im Dunkeln bei Raumtemperatur oder 2 – 8 °C aufbewahrt, können die Röhrchen während 2 – 3 Wochen verwendet werden.

Vor der Anwendung darf die Oberfläche des Mediums nicht übermäßig nass sein.

Flaschenmedium nur einmal verflüssigen. Mögliches Restmedium nicht erstarren lassen und ein zweites Mal verflüssigen, da wiederholtes Erhitzen die Bestandteile des Mediums schädigt, was zu einer unzureichenden mikrobiologischen Leistung führt.

## **Probenarten**

Das nicht ergänzte, in Petrischalen gegossene Medium wird in einer Vielzahl von Verfahren verwendet, z.B. für pharmazeutische Untersuchungen. In der klinischen Mikrobiologie darf es

nicht als Isolierungsmedium für Pathogene aus klinischen Proben verwendet werden, wenn es nicht mit Blut ergänzt wurde (z.B. 5 % Schafblut). Mit 5 % Blut ergänzt, kann das Plattenmedium als Universalmedium zur Erstisolierung von Pathogenen aus allen Probenarten verwendet werden. Betreffend Probenentnahme und –verarbeitung sind die Literaturhinweise zu beachten.<sup>4,10</sup> Das Schrägagar-Medium in Röhrcchen darf nicht direkt mit klinischen Proben verwendet werden, sondern nur für das Wachstum und die Erhaltung von Bakterienkulturen.

### Testverfahren

Vor der Verwendung sollten die Agaroberflächen des fertigen Mediums (in Petrischalen oder Röhrcchen) glatt und feucht sein, jedoch keine übermäßige Feuchtigkeit aufweisen, da dies zu konfluierendem Wachstum führen könnte.

Weitere Informationen über die spezifischen Verfahren sind der entsprechenden Literatur zu entnehmen.<sup>2,6,7</sup>

Mit Blut ergänzte Platten: Die Probe nach dem Eintreffen im Labor so bald wie möglich ausstreichen. Die Ausstrichplatte dient primär zur Isolierung von Reinkulturen aus Proben mit Mischflora. Wenn das Material direkt von einem Abstrich kultiviert wird, alternativ den Abstrichtupfer über einen kleinen Oberflächenbereich am Rand rollen; dann von diesem inokulierten Bereich aus ausstreichen. Platten oder Röhrcchen unter den gewählten Bedingungen inkubieren.

- Bei der Verwendung für klinische Proben, Platten/Röhrcchen 18 – 48 h (oder länger, falls nötig) bei  $35 \pm 2$  °C oder wie für den Organismus passend inkubieren.
- Bei Verwendung zur Hygieneüberwachung, Platten/Röhrcchen bis zu 5 Tage bei 30 – 35 °C inkubieren.

Bei Verwendung für pharmazeutische Materialien sind die Literaturhinweise zu beachten.<sup>1,2</sup>

Das Schrägagar-Medium in Röhrcchen wird zur Kultivierung und Erhaltung von Bakterienkulturen verwendet. Den Stamm direkt oder nach Suspension in Sterilwasser oder Salzlösung auf die gesamte Oberfläche des Schrägagars ausstreichen. Für das Isolat passend inkubieren. Während der Inkubation kann der Verschluss leicht gelöst werden, um eine Ventilation zu ermöglichen. Nach der Inkubation und während der Lagerung Röhrcchen komplett verschliessen.

### Ergebnisse

Nach der Inkubation können die Platten einen Bereich mit konfluierendem Wachstum aufweisen. Da es sich bei dem Ausstrichverfahren eigentlich um eine „Verdünnungsmethode“ handelt, werden geringere Mengen von Mikroorganismen auf den Ausstrichbereichen abgelagert. Folglich sollte(n) einer oder mehrere dieser Bereiche isolierte Kolonien der in der Probe enthaltenen Organismen aufweisen. Außerdem kann das Wachstum jedes Organismus auf der Basis des Wachstums in jedem der ausgestrichenen Bereiche semiquantitativ bestimmt werden.

- Plattengussverfahren: Entsprechende Literaturhinweise beachten.<sup>1,2,6,7</sup>

Mit einem geeignetem Inokulum inokuliert, zeigt die gesamte Oberfläche des Schrägagars Wachstum. Die Röhrcchen können für mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden, ohne dass die Kultur an Lebensfähigkeit verliert. Die Überlebenszeit hängt von den jeweiligen Stämmen ab.

Die Anzahl und Artenvielfalt der auf den aus **BD Tryptic Soy Agar** (Flaschenmedien) zubereiteten fertigen Medien wachsenden Organismen ist sehr groß. Aus diesem Grund können hier keine weiteren Einzelheiten zu ihrem Erscheinungsbild angegeben werden. Die Literaturhinweise sind zu beachten.<sup>4,9,10</sup> Von den auf den Medien erhaltenen Isolaten müssen geeignete Subkulturen angelegt werden, um eine weitere Differenzierung und Identifizierung zu ermöglichen.

## LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

**BD Tryptic Soy Agar** wird für eine Vielzahl industrieller mikrobiologischer Verfahren verwendet, z.B. in mikrobiellen Grenzwerttests und in der Wasser- und Nahrungsmittel-Mikrobiologie.<sup>1-3,6,7</sup>

Nicht ergänzter Tryptic-Soja-Agar wird zur Kultivierung von vielen weniger anspruchsvollen Bakterien verwendet. Dazu gehören *Enterobacteriaceae*, nicht fermentierende, gramnegative Stäbchen (*Pseudomonas* und andere), Enterokokken, Staphylokokken, Sporen-bildende Bakterien (*Bacillus* und verwandte Gattungen), sowie andere Organismen mit ähnlichen Wachstumsanforderungen. Das Medium eignet sich nicht für die Isolierung und Kultivierung von sehr anspruchsvollen Bakterien, wie z.B. *Neisseria* oder *Haemophilus*-Spezies, oder anderen Organismen mit speziellen Nährstoffanforderungen. Ebenfalls ist das Medium nicht optimal zur Isolierung von anspruchsvollen, obligaten Anaerobiern geeignet. Deshalb ist die Verwendung in

der klinischen Mikrobiologie auf spezielle Tests beschränkt, z.B. zur Differenzierung von *Haemophilus* mit Faktor X-, V- und XV-Streifen.<sup>8</sup>

Tryptic-Soja-Agar ergänzt mit Blut (z.B. 5 % Schafblut) wird in der klinischen Mikrobiologie häufig als Erstisolierungsmedium für aerobe Bakterien verwendet. Für Einzelheiten sind die Literaturhinweise zu beachten.<sup>3-5,8-10</sup>

Nicht ergänzter Tryptic-Soja-Agar enthält keine Verbindungen, welche aktiv Desinfektions- oder Konservierungsmittel neutralisieren. Wenn Materialien, die solche Verbindungen enthalten, oder vorher desinfizierte Oberflächen überwacht werden sollen, wird die Verwendung von Tryptic-Soja-Agar mit Lecithin und Polysorbat, oder eine geeignete Ergänzung empfohlen.

## LITERATUR

1. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 1994. The U.S. Pharmacopeia 24/The national formulary 19-1999. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
2. Council of Europe, 2002. European Pharmacopoeia, 4th edition, and Supplement 4.2. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
5. Nash, P., and M.M. Krenz. 1991. Culture media. In: A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Eaton, A.D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg (ed.). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. Downes, F.P., and K. Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
8. Campos, J.M. 1995. *Haemophilus*. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. NCCLS M2-A7. 1996. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media - 2nd edition; approved standard. National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Wayne, PA, USA.

## VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

### BD Tryptic Soy Agar (halbfertige Flaschenmedien)

Best.-Nr. 256665	10 Flaschen	100 mL Füllmenge; in 250 mL Sirupflasche
Best.-Nr. 257105	12 Flaschen	250 mL Füllmenge; in 500 mL Flachflasche
Best.-Nr. 257106	10 Flaschen	500 mL Füllmenge; in 500 mL Sirupflasche
Best.-Nr. 257240	4 Flaschen	400 mL Füllmenge; in 500 mL Laborflasche

## WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



BD Diagnostic Systems  
Tullastrasse 8 – 12  
D-69126 Heidelberg/Germany  
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16  
Reception\_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe  
Becton Dickinson France SA

11 rue Aristide Bergès  
38800 Le Pont de Claix/France  
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD and BD logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.  
Bacto is a trademark of Difco Laboratories, division of Becton, Dickinson and Company.  
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
© 2003 Becton, Dickinson and Company