BD BBL Enterotube II

VERWENDUNGSZWECK

BBL Enterotube II is ein gebrauchsfertiges Identifizierungssystem für *Enterobacteriaceae* und verschiedene andere oxidasenegative, gramnegative Stäbchen.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.
Enterobacteriaceae spielen eine wichtige Rolle als Infektionserreger. Diese Bakteriengruppe baut Kohlenhydrate hauptsächlich durch Fermentation und durch Oxidation ab. Sie sind katalasepositiv, und fast alle dieser Bakterien sind oxidasenegativ [es wurde kürzlich vorgeschlagen, *Plesiomonas shigelloides* in die *Enterobacteriaceae* aufzunehmen, basierend auf der 16S rRNA-Sequenzierung und weil dieser Organismus das allen Enterobakterien gemeinsame Antigen enthält.[1,2] Zuvor wurde dieser oxidasepositive Organismus der Familie der *Vibrionaceae* zugerechnet]. Die Identifizierung von *Enterobacteriaceae* basiert auf biochemischen Reaktionen, wie von Ewing und von Farmer beschrieben. Für Einzelheiten sind die Literaturhinweise zu beachten.[1-11]
Während eine große Vielzahl der Genera und Spezies im Laufe der Jahre beschrieben wurde, gehören die aus klinischen Proben isolierten Organismen zu 20 bis 25 Spezies, die bereits seit vielen Jahren bekannt sind.[1]
BBL Enterotube II ist ein in sich geschlossenes, in Kammern aufgeteiltes Kunststoffröhrchen mit zwölf unterschiedlichen Medien, die einen Nachweis von 15 biochemischen Reaktionen (Glucose, Gasproduktion aus Glucose, Lysin-Decarboxylase, Ornithindecarboxylase, Schwefelwasserstoff (H_2S), Indol, Adonit, Lactose, Arabinose, Sorbit, Voges-Proskauer (VP), Dulcit, Phenylalanindeaminase (PA), Harnstoff und Citrat) ermöglichen. Der integrierte Inokulationsdraht ermöglicht die Beimpfung aller Kammern in einem Arbeitsgang mit einer oder einigen wenigen Kolonien eines Isolats. Die resultierende Kombination der Reaktionen, zusammen mit dem Leitfaden zur Interpretation (Codebuch), ermöglicht die Identifizierung klinisch signifikanter *Enterobacteriaceae*.

Der Leitfaden zur Interpretation (Codebuch) für **BBL Enterotube II** wurde mithilfe der in der Literatur enthaltenen Prozentdaten zu den biochemischen Tests mit **BBL Enterotube II** zusammengestellt.[3-11] Der Ergebnisbogen und die Farbreaktionstabelle ermöglichen eine schnelle Kontrolle der mit **BBL Enterotube II** erzielten positiven Reaktionen. Die kontrollierten positiven Zahlen werden zusammengezählt, und die zusammengesetzte Nummer wird dann im Leitfaden zur Interpretierung zur Identifizierung der Organismen nachgeschlagen. Wenn zwei oder mehr Organismen aufgeführt sind, sind die erforderlichen Bestätigungstests zur weiteren Identifizierung ebenfalls angegeben.
Das folgende Flussdiagramm zeigt, wie der Oxidasetest zur Unterscheidung von Vertretern der *Enterobacteriaceae*-Familie von nicht-fermentativen, oxidasepositiven oder oxidasenegativen sowie von fermentativen, oxidasepostiven, gramnegativen Bakterien und bei Verwendung von **BBL Enterotube II** oder **BBL Oxi/Ferm Tube II** verwendet werden kann.

Reinkultur auf nichtslelektivem Medium
↓
Oxidasetest

positiv → **BBL Oxi/Ferm Tube II** inokulieren → Anaerobe Glucose

Positiv	Negativ
Aeromonas spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio* spp.	*Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Bordetella bronchiseptica*, *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp. usw.

negativ → **BBL Enterotube II** inokulieren → Glucose

Positiv	Negativ*
Enterobacteriaceae	*Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* usw.

* Diese Spezies lassen sich mit dem **BBL Enterotube II**-System identifizieren, zur Bestätigung kann jedoch die Verwendung von **BBL Oxi/Ferm Tube II** erforderlich sein.

REAGENZIEN

BBL Enterotube II

Substrate, andere aktive Bestandteile und die Färbung der nicht inokulierten Medien:

- Medium 1 (Glucose): Glucose (20,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Kresolrot als pH-Indikator. Das Medium ist mit Wachs bedeckt, um anaerobe Bedingungen zu schaffen und um die Bildung von Gas festzustellen. Unbeimpft: Rot.
- Medium 2 (Lysin): Lysin (10,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Bromkresolpurpur als pH-Indikator. Das Medium ist mit Wachs bedeckt, um anaerobe Bedingungen zu schaffen. Unbeimpft: Gelb.
- Medium 3 (Ornithin): Ornithin (10,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Bromkresolpurpur als pH-Indikator. Das Medium ist mit Wachs bedeckt, um anaerobe Bedingungen zu schaffen. Unbeimpft: Gelb.
- Medium 4 (H_2S/Indol): Natriumthiosulfat (4,7 g/L) , Eisen(III)-Ammoniumcitrat (0,6 g/L) und Tryptophan (1,2 g/L) in einem geeigneten Basismedium. Unbeimpft: Beige bis hell bernsteinfarben.
- Medium 5 (Adonit): Adonit (20,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Kresolrot als pH-Indikator. Unbeimpft: Rot.
- Medium 6 (Lactose): Lactose (20,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Kresolrot als pH-Indikator. Unbeimpft: Rot.
- Medium 7 (Arabinose): Arabinose (20,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Kresolrot als pH-Indikator. Unbeimpft: Rot.
- Medium 8 (Sorbit): Sorbit (20,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Kresolrot als pH-Indikator. Unbeimpft: Rot.
- Medium 9 (Voges-Proskauer): Glucose (20,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium. Unbeimpft: Farblos bis hell bernsteinfarben.
- Medium 10 (Dulcit/PA): Dulcit (20,0 g/L), Phenylalanin (7,0 g/L) und Eisen(III)-Ammoniumcitrat (0,5 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Bromthymolblau als pH-Indikator.
- Unbeimpft: Grün.
- Medium 11 (Harnstoff): Harnstoff (20,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Phenolrot als pH-Indikator. Unbeimpft: Beige bis hell bernsteinfarben.
- Medium 12 (Citrat): Natriumcitrat (2,0 g/L), enthalten in einem geeigneten Basismedium, mit Bromthymolblau als pH-Indikator. Unbeimpft: Grün.

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal

Röhrchen bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Wachsablösung vom jeweiligen Medium, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

Jede der folgenden Bedingungen kann die Genauigkeit von **BBL Enterotube II** beeinträchtigen: Dehydratation oder Verflüssigung, Anheben des Wachses von den Medienoberflächen, jede Änderung der Medienfarben gegenüber den im Abschnitt **REAGENZIEN** unter „Unbeimpft“ beschriebenen Farben, und jedes Anzeichen von Wachstum auf den Medienoberflächen.

Folgende Vorsichtsmaßnahmen gelten für die einzelnen angegebenen Kammern:

- **Glucose:** Die Wachsabdeckung in dieser Kammer liefert den Anaerobiosegrad, der erforderlich ist, um nur die echte, für alle *Enterobacteriaceae* charakteristische Fermentationsreaktion zu ermöglichen. Wenn dieses Medium nach der Inokulation und Inkubation rot bleibt, gehört der Stamm nicht zu den *Enterobacteriaceae*. Beispiele von oxidasenegativen Nicht-*Enterobacteriaceae*, die unter anaeroben Bedingungen in **BBL Enterotube II** keine Glucose fermentieren, sind die glucosenegativen *Acinetobacter*-Spezies. Obgleich sich diese Organismen mithilfe von **BBL Enterotube II** von *Enterobacteriaceae* unterscheiden lassen (im Leitfaden zur Interpretierung die Datenbank für oxidasenegative Nichtfermenter verwenden), kann **BBL Oxi/Ferm Tube II** für ihre weitere Identifizierung erforderlich sein.
- **Phenylalanin (PA):** Dieses Medium kann nach der Inkubation einen dunkleren Grünton annehmen. Dies ist als negativ zu werten.

Warnung: Bei der Herstellung der oder beim Umgang mit Indol- und VP-Reagenzien müssen die geeigneten Anweisungen zum Umgang sowie die Risiko- und Sicherheitshinweise beachtet werden. Hinweise zu Verfahren aseptischer Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des gebrauchten Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt **Enterotube II** bis unmittelbar vor dem Gebrauch im Dunkeln bei 2 – 8 °C in der Originalverpackung lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Röhrchen können bis zum Verfallsdatum inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden. Röhrchen aus geöffneten Verpackungen können bis zum Verfallsdatum verwendet werden. Geöffnete Röhrchen müssen umgehend verwendet werden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

BBL Enterotube II mit den nachstehend aufgeführten Stämmen inokulieren. Zur Inokulation, Inkubation und zum Ablesen wie unter **Testverfahren** beschrieben vorgehen.

ORGANISMEN	**Glucose**	**Gas**	**Lysin**	**Ornithin**	**H_2S**	**Indol**	**Adonit**	**Lactose**	**Arabinose**	**Sorbit**	**VP**	**Dulcit**	**Phenyl-alanin**	**Harnstoff**	**Citrat**	**Zulässige Biocodes**
Proteus mirabilis ATCC 12453	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	66007 / 66006 / 46007
Proteus vulgaris ATCC 6380	+/(+)	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	63007 / 43007
Providencia alcali-faciens ATCC 9886	+	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-/+	61404 / 41405 / 41404 / 61405
Serratia marcescens ATCC 13880	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	+	74461 / 54461 / 74061 / 54061
Escherichia coli ATCC 25922	+	+/-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	75340 / 55340
Klebsiella pneumoniae ATCC 27736	+	+/-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-/+	+	50771 / 70771 / 70773 / 50773
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-/(+)	+	*

* *P. aeruginosa* ist oxidasepositiv und aus diesem Grund nicht in den **BBL Enterotube II**-Datenbanken enthalten. Dieser Stamm ist jedoch ein nützlicher Kontrollorganismus für den Nachweis von negativen Reaktionen in den Glucose- und Gaskammern.

+= positiv; – = negativ; (+) schwach positiv; +/- = positiv oder (selten) negativ; +/(+) = positiv oder (selten) schwach positiv; -/+= negativ oder (selten) positiv.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BBL Enterotube II. Mikrobiologisch kontrolliert.
Ergebnisbogen und Farbreaktionstabelle für **BBL Enterotube II**.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Leitfaden zur Interpretierung von **BBL Enterotube II** (Codebuch), Dokument-Nr. CM-273176.CE - unterteilt in drei Datenbanken: (1) Oxidasenegative Nonfermenter, (2) *Enterobacteriaceae* – Methode ohne VP, und (3) *Enterobacteriaceae* – Methode mit VP.
Kovacs' Indole Reagenz (Indol Dropper Reagenz, 50 Ampullen, Best.-Nr. 261185), und Voges-Proskauer-Regenzien (Voges-Proskauer A Dropper Reagent, 50 Ampullen, Best.-Nr. 261192; Voges-Proskauer B Dropper Reagent, Best.-Nr. 261193) sind bei BD erhältlich.
Materialien und Reagenzien zur Durchführung der Zusatztests, wie im Leitfaden zur Interpretierung für **BBL Enterotube II** beschrieben.

BBL Oxi/Ferm II-Identifikationssystem (Best.-Nr. 212116) zur Identifizierung von Nicht-*Enterobacteriaceae.*
Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Kovác-Indol-Reagenz kann im Labor wie folgt vorbereitet werden:

Amyl- oder Isoamylalkohol	75 mL
p-Dimethylaminobenzaldehyd	5 g
Salzsäure, konzentriert	25 mL

p-Dimethylaminobenzaldehyd (die Substanz sollte eine hellgelbe Farbe haben) in Alkohol verdünnen und dann die Säure langsam hinzugeben. Das fertige Reagenz sollte strohgelb sein und zur Gewährleistung

der höchstmöglichen Stabilität in einer braunen Flasche gekühlt gelagert werden. Reagenzien von dunkelbrauner Farbe dürfen nicht verwendet werden.

Voges-Proskauer-Reagenzien können wie folgt hergestellt werden:

5% Alpha-Naphthollösung	
Alpha-Naphthol	5 g
Ethanol (Ethylalkohol), absolut	100 mL

20% Kaliumhydroxidlösung	
Wasser	100 mL
Kaliumhydroxid (Pellets)	20 g
Kreatin	300 mg

Nach der Herstellung sind Voges-Proskauer-Reagenzien zwei Wochen lang stabil, wenn sie in dicht verschlossenen Flaschen im Dunkeln bei 2 to 8 °C gelagert werden.

Probenarten

BBL Enterotube II ist ein biochemisches Identifikationssystem, das **nicht** direkt mit klinischen Proben verwendet werden darf. Isolate von den entsprechenden Medien verwenden (siehe **Testverfahren**). **BBL Enterotube II** kann zur Identifizierung aerober, fakultativ anaerober gramnegativer Stäbchen *(Enterobacteriaceae)* verwendet werden, die aus einer beliebigen Probe isoliert wurden.

Testverfahren

Für die Inokulation von **BBL Enterotube II** kann Wachstum von MacConkey (MAC)-Agar, Eosin-Methylenblau (EMB)-Agar, Salmonella-Shigella (SS)-Agar oder Hektoen-Enteroagar (HE) bzw. von nichtselektiven Blutagarmedien verwendet werden. Die für die Inokulation verwendete Kultur sollte wenigstens 18 h alt, jedoch im Allgemeinen nicht älter als 48 h sein. Es muss sichergestellt sein, dass das Isolat, das mit **BBL Enterotube II** identifiziert werden soll, eine Reinkultur eines gramnegativen Stäbchens ist. **BBL Enterotube II** sollte nur bei oxidasenegativen Isolaten verwendet werden, da oxidasepositive Organismen (Nicht-*Enterobacteriaceae)* zu ihrer Identifizierung die Verwendung von **BBL Oxi/Ferm Tube II** erfordern.

1. Einen Bogen vom Auswerteblock für das Isolat vorbereiten. Hierzu den Patientennamen, die Probennummer und das Datum eintragen.
   Hinweis: Der Benutzer muss entscheiden, ob die Datenbank mit oder ohne VP verwendet werden soll. Je nach Entscheidung muss die Vorder- oder die Rückseite des Auswerteblocks verwendet werden. Wenn die Datenbank ohne VP gewählt wird, kann es erforderlich sein, die VP-Reaktion als Zusatztest für bestimmte Organismen durchzuführen.
2. Ein **BBL Enterotube II**-Röhrchen nehmen und das Etikett mit dem Patientennamen, der Probennummer und dem Datum beschriften.
3. Beide Kappen abnehmen. Die Spitze des Inokulationsdrahtes befindet sich unter der weißen Kappe. Den Draht nicht über einer Flamme erwärmen.
4. Eine gut isolierte Kolonie direkt mit der Spitze des **BBL Enterotube II**-Inokulationsdrahtes **(Abbildung 1)** aufnehmen. Eine sichtbare Menge Inokulum sollte an der Spitze und an den Seiten des Drahts zu sehen sein. Den Agar nicht mit dem Draht berühren. Nach Bedarf (Erfahrungswert) weitere Kolonien mit einer oder mehreren **BBL Enterotube II** aufnehmen.
5. **BBL Enterotube II** inokulieren. Hierzu zunächst den Draht verdrehen und ihn dann in einer Drehbewegung durch alle zwölf Kammern ziehen **(Abbildung 2)**.
6. Den Draht (ohne Sterilisierung) wieder mit einer Drehbewegung durch alle 12 Kammern in **BBL Enterotube II** einführen, bis die Kerbe am Draht mit der Öffnung am Röhrchen ausgerichtet ist **(Abbildung 3)**. Die Spitze des Drahts sollte in der Citratkammer zu sehen sein. Den Draht durch Abknicken an der Kerbe abbrechen. Der im Röhrchen verbleibende Teil des Drahts hält die anaerobe Umgebung aufrecht, die für die echte Glucosefermentierung, die Produktion von Gas und die Decarboxylierung von Lysin und Ornithin erforderlich ist.
7. Mit dem abgebrochenen Teil des Drahts Löcher durch die Folie stechen, die die Lufteinlässe der letzten acht Kammern bedeckt (Adonit, Lactose, Arabinose, Sorbit, Voges-Proskauer, Dulcit/PA, Harnstoff und Citrat), um so das aerobe Wachstum in diesen Kammern zu fördern **(Abbildung 4)**. Beide Kappen wieder aufsetzen.
8. Bei 35 bis 37 °C 18 bis 24 h lang inkubieren, dabei muss **BBL Enterotube II** entweder flach liegen liegen oder senkrecht stehen. Zwischen den inkubierten Röhrchen für Luftzirkulation sorgen.
9. Alle Reaktionen mit Ausnahme von Indol und Voges-Proskauer interpretieren und dokumentieren (für genaue Anweisungen zum Ablesen der Ergebnisse von **BBL Enterotube II** siehe den Abschnitt **Ergebnisse**). Alle anderen Tests müssen vor der Durchführung des Indoltests und des Voges-

Proskauer-Tests abgelesen werden, da die für diese Tests hinzugefügten Reagenzien die restlichen **BBL Enterotube II**-Reaktionen beeinträchtigen können.

Zugabe der **Indol- und Voges-Proskauer**-Reagenzien:

1. **BBL Enterotube II** horizontal auf den Arbeitstisch legen oder vertikal in ein Rack stellen, wobei die Glucosekammer nach unten zeigen muss. Mittels Nadel oder dem abgebrochenen Ende eines **BBL Enterotube II**-Impfdrahtes oder durch Schmelzen mit erhitztem Impfdraht ein Loch von etwa 3-4 mm Durchmesser in die Plastikfolie über der Indol/H2S und der VP-Kammer stanzen oder schmelzen.
2. **Durchführung des Indoltests:** 3 - 4 Tropfen Kovác-Reagenz (Best.-Nr. 261185, alternativ im Labor hergestelltes Reagenz; siehe Abschnitt **Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial**) in die H_2S/Indolkammer geben. Das Reagenz muss mit der Oberfläche des Mediums in Kontakt kommen. Ein positiver Test wird durch Rotfärbung des zugegebenen Reagenzes innerhalb von 10 sec angezeigt
3. **Durchführung des Voges-Proskauer-Tests:** Dieser Test ist obligatorisch bei Verwendung der Datenbank mit VP. Es kann darüber hinaus erforderlich sein, diesen Test als Bestätigungstest durchzuführen, wenn die Datenbank ohne VP gewählt wurde.
   Bei Verwendung selbsthergestellter Reagenzien (siehe Abschnitt **Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial**) zwei Tropfen 20%iger Kaliumhydroxidlösung mit 0,3 % Kreatin und drei Tropfen 5%igem alpha-Naphthol in absolutem Ethylalkohol zugeben. Ein positiver Test wird durch die Entwicklung einer Rotfärbung innerhalb von 15-20 min angezeigt. Mit dem Ablesen nicht länger als 20 min warten!
   Bei Verwendung von Dropper Reagenzien 3 - 5 Tropfen Voges-Proskauer A Reagenz (Best.-Nr. 261192) und 1 - 2 Tropfen Voges-Proskauer B Reagenz (Best.-Nr. 261193) zugeben. Eine positive Reaktion wird durch die Entwicklung einer kirschroten Farbe innerhalb von 5-15 min angezeigt. Eine kupferfarbene oder braune Verfärbung muss als negativ bewertet werden. Mit dem Ablesen nicht länger als 15 min warten!

Ergebnisse

Zur Identifizierung des Isolats den Anweisungen unten folgen. Die Informationen zum Erscheinungsbild der positiven und negativen Reaktionen sind in Tabelle 1 angegeben.

Hinweis: Wenn keine Farbänderung oder eine Orangefärbung in der Glucosekammer auftritt und sich Wachstum anhand von Farbänderungen in anderen Kammern feststellen lässt, ist der Organismus kein Mitglied der *Enterobacteriaceae*-Familie (siehe den Abschnitt **VORSICHTSMASSNAHMEN**).

1. Alle Reaktionen nach 18 bis 24 Inkubationsstunden interpretieren. Mit Ausnahme von Indol und VP alle Reaktionen der Reihe nach ablesen. Hierzu die Farben der Medien im Röhrchen nach der Inkubation mit denen im Farbdiagramm auf dem Deckblatt des Auswerteblocks und (ggf.) mit einer nicht inokulierten, auf Raumtemperatur erwärmten **BBL Enterotube II** vergleichen **(Abbildung 5)**. Alle Reaktionen, die positiv sein sollen, können die gleiche, eine größere oder eine geringere Farbintensität zeigen als die in der Farbreaktionstabelle.
2. Jedes positive Testergebnis durch Einkreisen der Nummer unter der entsprechenden Kammer auf dem Ergebnisbogen kennzeichnen **(Abbildung 6)**.
3. Schließlich die Indol- und VP-Tests durchführen. Wenn diese positiv verlaufen, die entsprechenden Nummern auf dem vorbereiteten Bogen einkreisen. Der VP-Test ist nur dann Pflicht, wenn die Datenbank mit VP gewählt wurde.
4. Die eingekreisten Nummern in den Bereich in Klammern eintragen und die Summe in den freien Bereich unterhalb des Pfeils eintragen **(Abbildung 6)**.
5. Die fünfstellige Nummer im Leitfaden zur Interpretierung (Codebuch) nachschlagen und die beste(n) Antwort(en) in der Spalte mit dem Titel „ID-Wert“ feststellen. Sicherstellen, dass die richtige Datenbank verwendet wird [(1) Oxidasenegative Nichtfermenter, (2) *Enterobacteriaceae* – Methode ohne VP, und (3) *Enterobacteriaceae* – Methode mit VP]. In dem in Abbildung 6 gezeigten Beispiel wurde der Organismus als *Klebsiella pneumoniae* identifiziert.

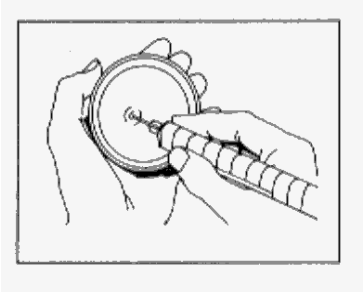


Abbildung 1

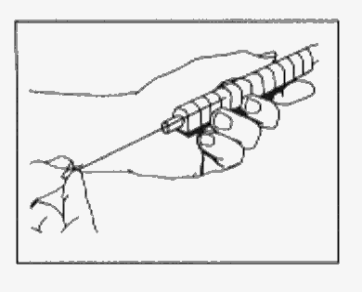


Abbildung 2

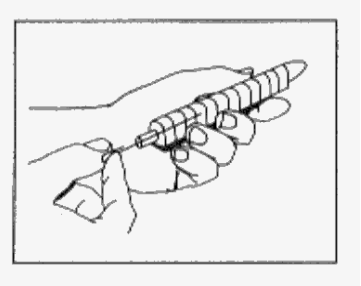


Abbildung 3

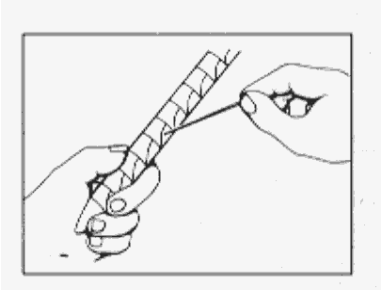


Abbildung 4

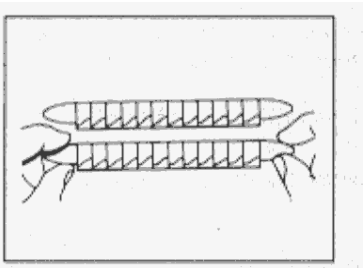
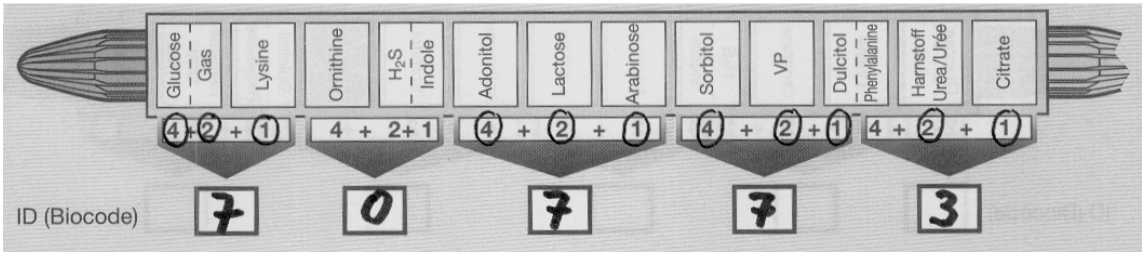
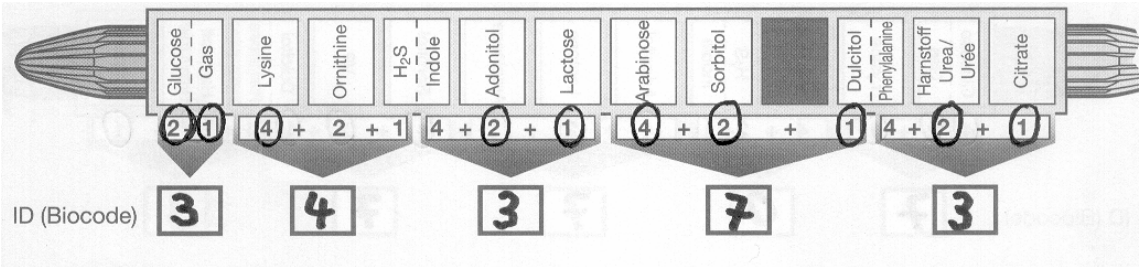


Abbildung 5



(A)



(B)

Abbildung 6: Ergebnisbogen von **BBL Enterotube II** (**A** = Datenbank mit VP; **B** = Datenbank ohne VP)

Tabelle 1: Erscheinungsbild negativer und positiver Reaktionen in BBL Enterotube II

Reaktionen			Anmerkungen
Reagenzien	**Negativ**	**Positiv**	
			KAMMER 1
Glucose	rot (bis orange)	gelb (bis golden)	**Glucose (GLU):** Die Endprodukte der bakteriellen Glucose-Fermentation sind entweder Säure, oder Säure und Gas. Die Änderung des pH-Werts aufgrund der Säurebildung wird durch die Farbänderung des Indikators im Medium von Rot (alkalisch) nach Gelb (sauer) angezeigt. Jegliche Gelbfärbung ist als positive Reaktion zu bewerten; Orange ist als negativ zu bewerten.
Gasproduktion	Wachs hebt sich nicht	Wachs hebt sich	**Gasproduktion (GAS):** Diese wird durch die definitive und vollständige Lösung der Wachsschicht von der Oberfläche des Glucosemediums nachgewiesen und nicht durch Blasen im Medium. Da die von den unterschiedlichen Bakterien produzierte Gasmenge variiert, variiert auch der Lösungsgrad der Wachsschicht vom Medium je nach getestetem Stamm.
			KAMMER 2
Lysin	Gelb bis bernsteinfarben	violett/ purpur	**Lysin-Decarboxylase (LYS):** Die bakterielle Decarboxylierung von Lysin, die zur Bildung des alkalischen Endprodukts Kadaverin führt, wird durch eine Farbänderung des Indikators im Medium von blassgelb oder bernsteinfarben (sauer) nach purpur oder violett (alkalisch) angezeigt. Das Medium bleibt gelb, wenn keine Decarboxylierung von Lysin erfolgt.
			KAMMER 3
Ornithin	Gelb bis bernsteinfarben	violett/ purpur	**Ornithindecarboxylase (ORN):** Die Decarboxylierung von Ornithin, die zur Bildung des alkalischen Endprodukts Putreszin führt, wird durch eine Farbänderung des Indikators im Medium von blassgelb oder bernsteinfarben (sauer) zu purpur oder violett (alkalisch) angezeigt. Das Medium bleibt gelb, wenn keine Decarboxylierung von Ornithin erfolgt.
			KAMMER 4
H_2S	beige bis hell bernstein-farben	schwarz	**Schwefelwasserstoffbildung (H_2S):** Schwefelwasserstoff wird von Bakterien gebildet, die schwefelhaltige Stoffe, wie beispielsweise im Medium vorhandene Peptone und Natriumthiosulfat reduzieren können. Der Schwefelwasserstoff reagiert mit den Eisensalzen, die ebenfalls im Medium vorhanden sind, und bildet ein schwarzes Eisensulfidpräzipitat, üblicherweise entlang der Inokulationslinie. Einige *Providencia*-Stämme können eine diffuse Braunfärbung im Medium hervorrufen, dies ist jedoch nicht mit der echten H_2S-Bildung, durch das Vorhandensein der Schwarzfärbung angezeigt, zu verwechseln. **Hinweis:** Das schwarze Präzipitat kann verblassen oder wieder in den negativen Zustand wechseln, wenn **BBL Enterotube II** nach einer Inkubationszeit von 24 h abgelesen wird.
Indol-Bildung	farblos	rosarot	**Indol-Bildung (IND):** Die Bildung von Indol aus dem Metabolismus von Tryptophan durch das bakterielle Enzym Tryptophanase wird durch die Entstehung einer rosa bis roten Färbung nach Zugabe von Kovác-Indol-Reagenz angezeigt, das nach einer Inkubationszeit des Röhrchens von 18 bis 24 h in die Kammer gegeben wird (siehe Abschnitt **Testverfahren**).
			KAMMERN 5, 6, 7, 8
Adonit, Lactose, Arabinose, Sorbit	rot (bis orange)	gelb (bis gold-farben)	**Adonit (ADON), Lactose (LAC), Arabinose (ARAB), Sorbit (SORB):** Die bakterielle Fermentation von Adonit, Lactose, Arabinose und Sorbit resultiert in der Bildung von sauren Endprodukten und wird durch einen Farbumschlag des im Medium vorhandenen Indikators von rot (alkalisch) nach gelb (sauer) angezeigt. Jedes Anzeichen einer Gelbfärbung ist als positive Reaktion zu werten; orange ist als negativ zu bewerten.

(Tabelle 1: fortgesetzt**)**

Reaktionen			Anmerkungen
Reagenzien	**Negativ**	**Positiv**	
			KAMMER 9
Voges-Proskauer	farblos bis bräunlich	rot	**Voges-Proskauer (VP):** Acetylmethylcarbinol (Acetoin) ist ein intermediärer Stoff bei der Bildung von Butylenglycol bei der Glucosefermentierung. Die Bildung von Acetoin wird nach Bebrütung durch die Zugabe der VP-Reagenzien nachgewiesen (siehe Abschnitt **Testverfahren**). Das Vorhandensein von Acetoin wird durch eine Rotfärbung innerhalb von 5-20 min angezeigt.
			KAMMER 10
Dulcitol	grün	gelb (bis gold-farben)	**Dulcit (DUL):** Die bakterielle Fermentation von Dulcit resultiert in der Bildung von sauren Endprodukten und wird durch einen Farbumschlag des im Medium vorhandenen Indikators von grün (alkalisch) nach gelb oder blassgelb (sauer) angezeigt.
PA	jeder Grünton	schwarz bis rauchgrau	**Phenylalanindeaminase (PA):** Mit diesem Test wird die Bildung von Brenztraubensäure aus der Deaminierung von Phenylalanin nachgewiesen. Die entstandene Brenztraubensäure reagiert mit einem im Medium vorhandenen Eisensalz und bildet eine charakteristische schwarze bis rauchgraue Färbung. Es muss kein Eisenschlorid zugegeben werden, da das Medium bereits ein Eisensalz enthält.
			KAMMER 11
Harnstoff	beige bis hell bernstein-farben	hellrosa bis rosa	**Harnstoff (UREA):** Urease ist ein Enzym, das eine Vielzahl von Mikroorganismen besitzen. Es hydrolysiert Harnstoff zu Ammoniak, wodurch sich die Farbe des Indikators im Medium von Gelb (sauer) nach Rot-Violett (alkalisch) ändert. Der Ureasetest ist stark positiv für die *Proteus*-Spezies und die Reaktion ist bereits 4 bis 6 h nach der Inkubation sichtbar; der Ureasetest zeigt nach 18 bis 24 h Inkubation eine schwach positive Reaktion (hellrosa Farbe) für die *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Spezies.
			KAMMER 12
Citrat	grün	blau	**Citrat (CIT):** Dieser Test weist die Organismen nach, die Citrat in Form von Natriumsalz als einzige Kohlenstoffquelle abbauen können. Organismen, die Citrat abbauen können, produzieren alkalische Metaboliten, durch die sich die Farbe des Indikators von Grün (sauer) nach Dunkelblau (alkalisch) ändert. Jeder Grad einer Blaufärbung ist als positiv zu werten. HINWEIS: Bestimmte Mikroorganismen produzieren nicht immer die ideal „starke" positive Farbänderung. Hellere Farbtöne derselben Grundfarbe sind ebenfalls als positiv zu werten.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BBL Enterotube II wurde speziell zur Identifizierung gramnegativer und oxidasenegativer Stäbchen entwickelt und sollte nur zur Unterscheidung von Mitgliedern der *Enterobacteriaceae*-Familieverwendet werden. Eine begrenzte Anzahl oxidasenegativer Nichtfermenter lässt sich ebenfalls mit diesem System identifizieren, für diese Organismen wird jedoch die Verwendung von **BBL Oxi/Ferm Tube II** empfohlen.

Leistungsmerkmale

BBL Enterotube II wurde in mehreren externen Studien bewertet. Die veröffentlichten Daten geben eine Identifizierungsgenauigkeit von 87 bis 99 % an. [12-14]

Reproduzierbarkeit: Insgesamt 10 Organismen wurde doppelt in einem Zeitraum von drei Tagen von drei unabhängigen Labors unter Verwendung von **BBL Enterotube II** getestet. Drei (30 %) der Organismen zeigten identische Biocodes bei jedem Replikat in jedem der Testlabors. Fünf (50 %) der Organismen zeigten geringe Abweichungen der Biocodes, lieferten jedoch bei jedem Replikat eine identische Identifizierung der Organismen. Zwei (20 %) der Organismen zeigten geringfügige Abweichungen der Biocodes bei identischer Identifizierung, wobei bei 2 von 18 Replikaten die Biocodes für diese Organismen nicht identifizierbar waren. Für alle Replikate gab es eine Übereinstimmung von 98,9 % bei der Identifizierung.

In einer Studie wurden 247 zuvor identifizierte Stämme (einschließlich bekannte ATCC-Kulturen) mithilfe des **BBL Enterotube II**-Identifikationssystems analysiert. Bei der ersten Inokulation zeigten neun

Organismen biochemische Diskrepanzen. Bei der erneuten Inokulation wurden acht dieser Diskrepanzen korrigiert. In fünf Fällen war das korrigierte Ergebnis gleich dem ersten Ergebnis der Referenzmethode. In drei Fällen war das korrigierte Ergebnis gleich dem ersten **BBL Enterotube II**-Ergebnis. In einem Fall wich das korrigierte Ergebnis von jedem Anfangsergebnis ab. Der abweichende biochemische Test wurde durch den Einsatz einer dritten Methode korrigiert, die dasselbe Ergebnis wie bei Verwendung von **BBL Enterotube II** lieferte.
Die Studienproben sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Dort aufgeführt sind Angaben zum Genus, der Spezies, der Anzahl getesteter Stämme und dem Prozentsatz der Organismen, die positive biochemische Reaktionen liefern.

Verfahrensbeschränkungen

BBL Enterotube II wurde für die hier aufgeführten Taxa entwickelt. Andere als die in Tabelle 3 aufgeführten Taxa sind nicht für die Verwendung in diesem System vorgesehen.
BBL Enterotube II-Biocodes können nicht zur Bestimmung des Phänotyps bei Isolaten derselben oder unterschiedlicher Proben verwendet werden.
Die mit **BBL Enterotube II** erhaltenen biochemischen Ergebnisse können von denen anderer Methoden und den in Veröffentlichungen angeführten Ergebnissen abweichen.
Zur Bestätigung der *Salmonella* und *Shigella* spp. sind serologische Tests erforderlich. Für eine vollständige Serotyp-Bestimmung und epidemiologische Überwachung müssen Isolate dieser Organismen an die entsprechenden Referenzlabors gesendet werden.
Die Identifizierung von gramnegativen Bakterien muss im Hinblick auf weitere Eigenschaften vorgenommen werden, wie beispielsweise den Ursprung der Probe, die Krankengeschichte des Patienten, der Kolonie- und Mikroskop-Morphologie, die Serologie und die antimikrobiellen Empfindlichkeitsmustern.
Die Identifizierung seltener Isolate sollte wiederholt oder es sollten zusätzliche Tests durchgeführt werden, um die Identifizierung derartiger Organismen zu bestätigen.
Einige Stämme bestimmter Organismen können aufgrund ungewöhnlicher Nährstoffanforderungen oder Mutationen atypische biochemische Reaktionen zeigen und somit nur schwer zu identifizieren sein.
Einige Organismen benötigen möglicherweise eine längere Inkubationszeit als 24 h zur korrekten Identifizierung.
Obgleich kürzlich der Vorschlag aufkam, *Plesiomonas shigelloides* in die Familie der *Enterobacteriaceae* aufzunehmen, ist diese Spezies nicht in den **BBL Enterotube II**-Datenbanken enthalten.[1,2] Statt dessen muss dieser Organismus mithilfe des **BBL Oxi/Ferm Tube II**-Systems und der entsprechenden Datenbank getestet werden.

Tabelle 2: Ergebnisse der Leistungsbewertung

		% Stämme mit positiver Reaktion													
Organismen	**Anzahl Test-stämme**	**GLU**	**GAS**	**LYS**	**ORN**	**H_2S**	**IND**	**ADO**	**LAC**	**ARA**	**SOR**	**DUL**	**PA**	**UREA**	**CIT**
ACINETOBACTER															
A. anitratus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
*A. lwoffii**	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BURKHOLDERIA															
B. cepacia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
CEDECEA															
C. davisae	1	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
*C. lapagei**	1	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100
CITROBACTER															
C. amalonaticus	1	100	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	0	100	100
C. freundii	4	100	100	0	0	100	0	0	50	100	100	0	0	50	50
ESCHERICHIA															
E. coli	83	100	92	100	78	0	99	0	88	99	100	1	0	0	0
ENTERIC GROUPS															
Enteric Group 60*	2	100	100	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
ENTEROBACTER															
E. aerogenes	5	100	100	100	100	0	0	100	80	100	100	0	0	0	100
E. amnigenus Bio. 1	2	100	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100
E. cloacae	10	100	100	10	90	0	0	10	100	100	100	20	0	10	80
EWINGELLA															
E. americana	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
HAFNIA															
*H. alvei**	3	100	100	100	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0

		% Stämme mit positiver Reaktion													
Organismen	**Anzahl Test-stämme**	**GLU**	**GAS**	**LYS**	**ORN**	**H_2S**	**IND**	**ADO**	**LAC**	**ARA**	**SOR**	**DUL**	**PA**	**UREA**	**CIT**
KLEBSIELLA															
*K. oxytoca**	8	100	0	100	0	0	100	100	100	100	100	38	0	100	100
K. ozaenae	4	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	50	0	50	100
K. pneumoniae	20	100	100	100	0	0	0	65	100	100	100	30	0	100	100
KLUYVERA															
*K. ascorbata**	1	100	100	100	100	0	100	0	100	100	0	0	0	0	100
MORGANELLA															
M. morganii	2	100	100	0	100	0	100	0	0	0	0	0	100	100	50
PROTEUS															
*P. mirabilis**	4	100	75	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100
PROVIDENCIA															
*P. rettgeri**	2	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100
*P. stuartii**	1	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	100
SALMONELLA															
Salmonella species	41	100	100	100	98	100	0	0	0	100	100	100	0	0	100
Salmonella (ariz) IIIa	5	100	100	100	100	100	0	0	0	100	100	0	0	0	80
SERRATIA															
S. liquefaciens	3	100	100	100	100	0	0	0	67	100	100	0	100	100	67
*S. marcescens**	5	100	20	100	100	80	0	0	0	0	80	0	0	0	100
S. plymuthica	1	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0
SHIGELLA															
Shigella srgps A,B,C	10	100	0	0	0	0	20	0	0	20	0	0	0	0	0
S. sonnei	17	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
YERSINIA															
Y. enterocolitica	1	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0
Y. frederiksenii	2	100	100	0	100	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0
Y. ruckeri	2	100	0	50	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0

* Ein Stamm aus dieser Gruppe stammt aus der ATCC (American Type Culture Collection).

Tabelle 3: In den BBL Enterotube II-Datenbanken enthaltene Taxa von *Enterobacteriaceae*

Buttiauxella agrestis	*Hafnia alvei*	*Salmonella* serotype Pullorum
Cedecea davisae	*Hafnia alvei* biogroup 1	*Salmonella (arizonae)* IIIa
Cedecea lapagei	*Klebsiella pneumoniae*	*Salmonella (diarizonae)* IIIb
Cedecea neteri	*Klebsiella oxytoca*	*Serratia marcescens*
Cedecea species 3	*Raoultella (Klebsiella) ornithinolytica* (group 47)	*Serratia marcescens* biogroup 1
Cedecea species 5	*Klebsiella ozaenae*	*Serratia liquefaciens*
Citrobacter freundii	*Klebsiella rhinoscleromatis*	*Serratia rubidaea*
Citrobacter koseri (diversus)	*Kluyvera ascorbata*	*Serratia odorifera* biogroup 1
Citrobacter amalonaticus	*Kluyvera cryocrescens*	*Serratia odorifera* biogroup 2
Citrobacter farmeri	*Leclercia adecarboxylata*	*Serratia plymuthica*
Edwardsiella tarda	*Leminorella* sp.	*Serratia ficaria*
Edwardsiella tarda biogroup 1	*Moellerella wisconsensis*	*Serratia fonticola*
Edwardsiella hoshinae	*Morganella morganii*	*Shigella* serogroups A, B, C
Edwardsiella ictaluri	*Morganella morganii biogroup 1*	*Shigella sonnei*
Enterobacter aerogenes	*Obesumbacterium proteus* biogroup 2	*Tatumella ptyseos*
Enterobacter asburiae	*Pantoea agglomerans* (*Enterobacter agglomerans* complex)	*Yersinia enterocolitica*
Enterobacter cloacae	*Proteus mirabilis*	*Yersinia frederiksenii*
Enterobacter gergoviae	*Proteus vulgaris*	*Yersinia intermedia*
Enterobacter sakazakii	*Proteus penneri*	*Yersinia kristensenii*
Enterobacter cancerogenus (taylorae)	*Proteus myxofaciens*	*Yersinia pestis*
Enterobacter amnigenus biogroup 1	*Providencia rettgeri*	*Yersinia pseudotuberculosis*
Enterobacter amnigenus biogroup 2	*Providencia stuartii*	*Yersinia ruckeri*
Escherichia coli	*Providencia alcalifaciens*	*Yokenella regensburgeri*
Escherichia coli (AD), inactive	*Providencia rustiganii*	Enteric group 58
Escherichia fergusonii	*Salmonella species*	Enteric group 59
Escherichia hermanii	*Salmonella* serotype Typhi	Enteric group 60
Escherichia vulneris	*Salmonella* serotype Choleraesuis	
Escherichia blattae	*Salmonella* serotype Paratyphi A	
Ewingella americana	*Salmonella* serotype Gallinarum	

LITERATUR

1. Farmer, J.J. III. 2003. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Abbott, S.L. 2003. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Farmer, J.J, III., et al. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 21:46-76.
4. Ewing, W.H. 1973. Differentation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
5. Ewing, W.H. 1972. Biochemical characterization of Citrobacter freundii and Citrobacter diversus. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
6. Ewing, W.H., and M.A. Fife. 1971. Enterobacter agglomerans and the Herbicola-Lathyri bacteria. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
7. Darland, G., and B.R. Davis. 1973. Biochemical and serological characterization of hydrogen sulfide producing variants of Escherichia coli. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
8. Ewing, W.H. 1974. Isolation and identification of Salmonella and Shigella. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
9. Ewing, W.H., B.R. Davis, and M.A. Five. 1972. Biochemical characterization of Serratia liquefaciens and Serratia rubidaea. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
10. Brenner, D.J., et al. 1977. Taxonomic and nomenclature changes in Enterobacteriaceae. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.:, Oct. 1977.
11. Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Co., New York, N.Y.
12. Holmes, B. 1989. Comparative evaluation of the Roche Cobas IDA and Enterotube II systems for identifying members of the family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 27: 1027-1030.
13. Mastroeni, P. et al. 1983. Comparison of six systems for the identification of Enterobacteriaceae. G. Batteriol. Virol. Immunol. 76: 3-19.
14. Chiaradia, V. et al. 1983. Comparative evaluation of 3 miniaturized systems (API 20E, Enterotube II, Sensititre AP60) commonly used in clinical microbiology laboratories. Quad. Sclavo Diagn. 19: 159-175 [in Italian].

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BBL Enterotube II

Best.-Nr. 273176 25 Röhrchen

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.

Becton Dickinson GmbH
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, BD logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
Enterotube and Oxi/Ferm are trademarks of Becton Dickinson GmbH.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
© 2007 Becton, Dickinson and Company