

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

VERWENDUNGSZWECK

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate) (BD CHROMagar-Orientierungsmedium / Columbia-CNA-Agar (Doppelplatte)) wird zur Isolierung von üblicherweise an Harnwegsinfektionen beteiligten Bakterien verwendet. Während **CHROMagar Orientation Medium** ein nicht selektives Medium zur Isolierung, Identifizierung oder Differenzierung von Erregern von Harnwegsinfektionen ist, ist Columbia-CNA-Agar ein selektives Medium zur Isolierung von grampositiven Bakterien.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

CHROMagar Orientation Medium: *Escherichia coli*, Enterokokken, die *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*- und die *Proteus-Morganella-Providencia*-Gruppen sind die am häufigsten Harnwegsinfektionen (=UTI) verursachenden Organismen. Sechzig bis siebzig Prozent der Harnwegsinfektionen werden von *E. coli* in Reinkultur oder zusammen mit Enterokokken verursacht. *Staphylococcus saprophyticus* und *Streptococcus agalactiae* werden, wenn auch weniger häufig, in Harnwegsinfektionen bei Frauen angetroffen.

Einige der beteiligten Organismen produzieren Enzyme für den Metabolismus von Lactose oder Glukosiden oder beiden, während andere keines dieser Enzyme produzieren. So produziert beispielsweise *E. coli* Enzyme des Lactosemetabolismus, ist jedoch β -Glukosidase-negativ. Andere Mitglieder der *Enterobacteriaceae*-Familie sind β -Glukosidase-positiv, enthalten jedoch nicht die notwendigen Enzyme zur Lactosefermentierung, während andere beide Enzymarten oder keine davon enthalten. Beta-Glukosidasen sind auch in grampositiven Kokken zu finden, wie z.B. *Enterococcus* spp. und *Streptococcus agalactiae*. Tryptophan-Deaminase (TDA) ist ein Enzym, welches typischerweise in der *Proteus-Morganella-Providencia*-Gruppe von Organismen zu finden ist.

CHROMagar Orientation Medium erlaubt die Identifizierung von *E. coli*, Enterokokken und den meisten *Staphylococcus saprophyticus*- und *S. simulans*-Stämmen direkt auf der Isolierungsplatte. Weiterhin ist der Nachweis der *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (=KES)- und *Proteus-Morganella-Providencia* (=PMP)-Gruppen auf Grund der Kolonie- und Mediumfärbung möglich.¹⁻³ Da **CHROMagar Orientation Medium** nicht selektiv ist, wachsen auch andere Erreger von Harnwegsinfektionen, für deren Identifizierung jedoch biochemische Tests notwendig sind.

CHROMagar Orientation Medium wurde von A. Rambach entwickelt und wird von BD Diagnostic Systems unter einem Lizenzabkommen mit CHROMagar, Paris, Frankreich, vertrieben.

Speziell ausgewählte Peptone liefern die Nährstoffe in **CHROMagar Orientation Medium**. Die Chromogenmischung besteht aus künstlichen Substraten (Chromogenen), welche beim Abbau durch spezifische mikrobielle Enzyme verschiedenfarbige Verbindungen freisetzen, und so die direkte Differenzierung von bestimmten Spezies oder den Nachweis von bestimmten Gruppen von Organismen mit einem Minimum an Bestätigungstests sicherstellen.

Columbia-CNA-Agar: Ellner et al. berichteten über die Entwicklung einer neuen Blutagar-Zusammensetzung, die als Columbia Agar bezeichnet wurde.⁴ Dieses Medium, das größere Kolonien und ein ausgeprägteres Wachstum erzielt als vergleichbare Blutagar-Medien, wird für Kulturmedien, die Blut enthalten, und für selektive Zusammensetzungen verwendet. Ellner et al. entdeckten, dass ein Medium mit 10 mg Colistin und 15 mg Nalidixinsäure je Liter in Columbia-Agar-Basis, angereichert mit 5 % Schafblut, das Wachstum von Staphylokokken, hämolytischen Streptokokken und Enterokokken unterstützt und gleichzeitig das Wachstum von *Proteus*-, *Klebsiella*- und *Pseudomonas*-Spezies hemmt.⁴

Columbia-Agar ist ein nährstoffreiches Basismedium. Durch den Zusatz der Antibiotika Colistin und Nalidixinsäure ist das Medium selektiv für grampositive Mikroorganismen, insbesondere

Streptokokken und Staphylokokken. Schafblut wird zugegeben, um den Nachweis von hämolytischen Reaktionen zu ermöglichen.^{4,5}

REAGENZIEN

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

Ungefähre Zusammensetzungen* pro Liter destilliertem Wasser

CHROMagar Orientation Medium	
Chromopeptone	16,1 g
Chromogenmischung	1,3
Agar	15,0

pH 6,9 ± 0,2

Columbia CNA Agar			
Pankreatisch abgebautes Casein	12,0 g	Natriumchlorid	5,0 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	5,0	Agar	13,5
Hefeextrakt	3,0	Colistin	0,01
Rindfleischextrakt	3,0	Nalidixinsäure	0,015
Maisstärke	1,0	Schafblut, defibriniert	5 %

pH 7,3 ± 0,2

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch. ⓧ

Platten bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

Hinweise zu Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des gebrauchten Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Nach Erhalt Platten bis unmittelbar vor dem Gebrauch **im Dunkeln** bei 2 – 8 °C in der Originalverpackung lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Platten können bis zum Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.

Platten aus bereits geöffneten Packungen mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen, dunklen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden. **Vor und während der Inkubation vor Lichteinwirkung schützen, da Licht die Chromogene zerstört.**

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Repräsentative Proben mit den nachfolgend aufgeführten Stämmen inokulieren (detaillierte Informationen siehe **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG**). Platten nicht weniger als 20 – 24 h bei 35 – 37 °C aerob inkubieren.

Teststämme	CHROMagar Orientation Medium	Columbia CNA Agar
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum; kleine blau-grüne bis blaue Kolonien	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum; graue Kolonien; keine Hämolyse
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Mittleres bis gutes Wachstum; winzige blaue Kolonien	Mittleres bis ausgezeichnetes Wachstum; weiße bis graue Kolonien; Beta-Hämolyse
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum; weiße bis gelbliche Kolonien	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum; weißliche Kolonien, Beta-Hämolyse
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Mittleres bis ausgezeichnetes Wachstum; mittelgroße, transparente, pinkfarbene Kolonien	Vollständig gehemmtes Wachstum
<i>Streptococcus</i>	Gutes bis ausgezeichnetes	Teilweise bis vollständig gehemmtes

<i>pneumoniae</i> ATCC 27736	Wachstum; mittelgroße, dunkelblaue Kolonien mit blauen Höfen oder ohne	Wachstum
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum; blau-grüne Kolonien; umgebendes Medium bernsteinfarben bis braun	Teilweise bis vollständig gehemmtes Wachstum
Nicht inokuliert	Farblos bis hell beigefarben, transparent (kann eine moderate Menge an Partikeln aufweisen)	Rot (blutfarben)

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (90 mm **Stacker-**Doppelplatten). Mikrobiologisch kontrolliert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar ist ausschließlich zur Isolierung, quantitativen Bestimmung und Differenzierung von Bakterien im Urin vorgesehen. Als Probe eignet sich Mittelstrahl- oder Katheterurin, oder Urin der mittels einer suprapubischen Blasenpunktion gewonnen wurde (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**). Bei der Gewinnung von Urinproben aseptische Kautelen beachten. Der Urin muss spätestens 2 Stunden nach der Probenentnahme direkt auf dem Medium ausgestrichen oder gekühlt aufbewahrt (nicht länger als 24 h) werden, um ein Überwachsen der infektiösen Erreger oder Kontaminanten vor der Inokulation des Mediums zu verhindern.⁶⁻⁸

Testverfahren

Eine Probe des unverdünnten, gut durchmischten Urins unter Verwendung einer kalibrierten Impföse (0,01 oder 0,001 mL) entnehmen. Für die Inokulation von Medien auf Doppelplatten sind 0,001 ml (= 1 µL)-Impfösen zu bevorzugen. Auf die korrekte Füllung der Impföse mit der Probe achten. Zuerst die Probe auf einen kleinen Oberflächenbereich von **CHROMagar Orientation Medium** inokulieren und danach den übrigen Bereich des Medium inokulieren. Anschließend eine weitere Impföse voll Urin entnehmen und mit Columbia CNA Agar auf die selbe Weise verfahren. Wenn 10 µL-Ösen verwendet werden, wird eine zehnfache Vorverdünnung der Urinprobe in steriler physiologischer Kochsalzlösung empfohlen. Inokulierte Platten 20 – 24 h bei 35 – 37 °C h in umgedrehter Position aerob inkubieren. Die Inkubation dieser Doppelplatte in einer mit Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre wird nicht empfohlen. **Während der Inkubation vor Lichteinwirkung schützen, da Licht die Chromogene in CHROMagar Orientation Medium zerstören könnte.** Sobald sich die Farben der Kolonien entwickelt haben, ist Lichteinwirkung erlaubt.

Die Verwendung von kalibrierten Impfösen oder anderen gebräuchliche Verfahren zum Anlegen von Plattenkulturen aus Urinproben sind zwingend notwendig, um isolierte Kolonien mit typischen Farben und Formen zu erhalten.

Ergebnisse

Nach der Inkubation sollten die Medien in den Bereichen mit korrekt verdünntem Inokulum isolierte Kolonien aufweisen. **Schema 1** sollte zur Identifizierung oder Differenzierung und als Richtlinie für zusätzliche Bestätigungsreaktionen auf **CHROMagar Orientation Medium** hinzugezogen werden. Eine Gramfärbung und Mikroskopie können zur Bestätigung der Ergebnisse angewandt werden.

Auf Columbia-CNA-Agar wird sich bei Vorhandensein grampositiver Bakterien Wachstum zeigen. Detaillierte Informationen hierzu und zur Interpretation des Wachstums auf diesem Medium enthält die entsprechende Literatur.^{5,9}

Bestätigungstests

Für **CHROMagar Orientation Medium** Bestätigungstests gemäß Anforderungen durchführen (**Schema 1**). Keine Nachweisagencien, wie z.B. DMACA-Indol oder andere Reagenzien, direkt auf die Kolonien auf diesem Medium auftragen. Statt dessen sind die Tests auf Filterpapier mit Wachstum der jeweiligen Kolonien durchzuführen.

Für *E. coli*-Kolonien sollte Kovacs Indol-Reagenz nicht verwendet werden, da die Koloniefarbe mit der roten Farbe eines positiven Indol-Tests interferieren könnte. Stattdessen sollte Dimethylaminocinnamaldehyd-(DMACA)-Indol-Reagenz verwendet werden.

Wenn andere Bestätigungstests oder biochemische Identifizierungssysteme angewandt werden, sind die Gebrauchsinformationen dieser Tests oder Systeme zu befolgen.

Berechnung und Interpretation der Ergebnisse⁶⁻⁹

Die Anzahl der Kolonien (KBE) auf jedem Medium bestimmen. Wurde eine 0,001 mL-Impföse verwendet, entspricht jede Kolonie 1000 KBE/mL Urin.⁷

Mittelstrahl- und Katheterurin: Nach aktuellen Richtlinien deutet eine Dichte von $\geq 10^5$ KBE/mL eines Isolats auf eine Infektion hin, eine Dichte von $< 10^5$ KBE/mL deutet auf eine Kontamination der Harnröhre oder der Vagina hin und ein Wert zwischen 10^4 - 10^5 KBE/mL erfordert eine erneute Bewertung anhand der klinischen Informationen.

Kontaminante Bakterien treten meist in geringer Zahl und mit unterschiedlicher Koloniemorphologie auf.

Urin, der durch suprapubische Blasenpunktur gewonnen wurde: Da die Harnblase bei infektionsfreien Patienten steril ist, deutet jede nachgewiesene KBE auf eine Infektion hin.

Erreger in den Harnwegen ergeben auf diesem Medium üblicherweise hohe Anzahlen einheitlicher Koloniemorphologie und Farbe.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplatte) wird zur Isolierung, Identifizierung oder präsumtiven Identifizierung von üblicherweise an Harnwegsinfektionen beteiligten Bakterien verwendet.

BD CHROMagar Orientation Medium ist ein chromogenes Medium zur direkten Identifizierung, Differenzierung und quantitativen Bestimmung von häufig in den Harnwegen auftretenden Erregern. Das Medium eignet sich zur Isolierung einer Vielzahl von aerob wachsenden Mikroorganismen, z.B. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* und weitere nicht-fermentierende gramnegative Stäbchen, Enterokokken, Staphylokokken und viele andere Spezies, aus Urinproben.¹⁻³

Es erlaubt die direkte Identifizierung von *Escherichia coli* mit Hilfe der Koloniefarbe und einem bestätigenden Indoltest, sowie die direkte Identifizierung von *Enterococcus* und *Streptococcus agalactiae* auf Grund der Koloniefarbe und einem bestätigenden PYR-Test, oder alternativ einen serologischen Agglutinations-Test zum Nachweis der Lancefield-Gruppe. Andere Organismen können je nach Spezies entweder nach der Durchführung einiger Bestätigungstests identifiziert werden, oder sie benötigen eine vollständige biochemische Identifizierung. Da die meisten der häufig auftretenden Harnwegsinfektionen durch *E. coli* und/oder Enterokokken verursacht werden, führt die Anwendung dieses Mediums zu einem deutlich geringeren Arbeitsaufkommen und Zeitaufwand für die Inokulation und das Ablesen von Identifizierungssystemen, welche bei der Verwendung von konventionellen Isolierungsmedien notwendig wären.

Columbia CNA Agar ist ein Standard-Medium zur Isolierung und Kultivierung von zahlreichen aerob wachsenden grampositiven Mikroorganismen, z.B. Streptokokken, Staphylokokken, coryneforme Bakterien, *Listeria* spp, und andere.^{5,7,9}

Leistungsergebnisse^{2,10}

Zwei unabhängige Leistungsbeurteilungen wurden auf **CHROMagar Orientation Medium** durchgeführt. In beiden Untersuchungen wurden auf dem chromogenen Medium mehr Erreger nachgewiesen, als auf den zum Vergleich hinzugezogenen traditionellen Medien. Die Einzelheiten der ersten Beurteilung wurden veröffentlicht, und die Ergebnisse der ersten und

zweiten Beurteilung sind in der **Gebrauchsanweisung** von **BD CHROMagar Orientation Medium** (Best.-Nr. 254102) einzusehen.²

Verfahrensbeschränkungen

CHROMagar Orientation Medium: Kolonien, welche ihre natürliche Farbe aufweisen und nicht mit den chromogenen Substraten reagieren, müssen mit Hilfe geeigneter biochemischer und serologischer Tests weiter differenziert werden. Die Literaturhinweise sind zu beachten.^{9,11}

Andere gramnegative Stäbchen als jene der KES-Gruppe können große blaue Kolonien produzieren und benötigen deshalb zusätzliche biochemische Tests für ihre Identifizierung.¹¹

In sehr seltenen Fällen können *Listeria monocytogenes* und andere *Listeria*-Spezies im Urin vorhanden sein (z.B. nach einem Abort auf Grund dieser Erreger). *Listeria* produzieren kleine blaue bis blau-grüne Kolonien, welche PYR-negativ sind und *Streptococcus agalactiae* imitieren (siehe Schema 1). Aus diesem Grund könnte es nützlich sein, eine Gramfärbung aller Stämme, welche auf diesem Medium kleine, blaue bis blau-grüne Kolonien produzieren und PYR-negativ sind, zuzubereiten. Das Vorhandensein von grampositiven Stäbchen kann ein Anzeichen für *Listeria*-Spezies sein. Zusätzliche biochemische Tests sind notwendig, um das Vorhandensein dieser Organismen zu bestätigen.

Sehr selten können Isolate von *Aeromonas hydrophila* rosa- bis pinkfarbene Kolonien produzieren. Sie können von *E. coli* mit Hilfe eines Oxidase-Tests differenziert werden (*Aeromonas* = positiv; *E. coli* = negativ).

Gelegentlich können auch andere koagulase-negative Staphylokokken als *S. saprophyticus*, z.B. *S. simulans*, *S. xylosus* und *S. intermedius*, eine rosa- bis pinkfarbene Koloniefarbe annehmen. Aus diesem Grund ist es nötig, diese Isolate zusätzlichen Tests zu unterziehen (siehe Schema 1).

CHROMagar Orientation Medium unterstützt nicht das Wachstum von anspruchsvollen Organismen, wie z.B. *Neisseria*, *Haemophilus* oder *Mycoplasma* spp.

Die Verwendung dieses Mediums für andere klinische oder nicht klinische Proben, außer Urinproben, wurde nicht validiert.

Vor der erstmaligen Verwendung von **CHROMagar Orientation Medium** empfehlen wir, sich das typische Erscheinungsbild der Kolonien mit Hilfe von definierten Stämmen (z.B. den unter **QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER** erwähnten Stämmen) einzuprägen.

Columbia-CNA-Agar: Bakterien, die eine Resistenz gegen die selektiven Bestandteile aufweisen, können auf diesem Medium ebenfalls ein Wachstum aufweisen.

Das Wachstum von *Candida*-Spezies und anderen Pilzen wird auf diesem Medium nicht gehemmt.

Obwohl es sich hierbei um grampositive Bakterien handelt, wird das Wachstum aerober Sporenbildner wie beispielsweise *Bacillus* spp auf Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood unter Umständen gehemmt.

Obwohl bestimmte diagnostische Tests direkt auf diesem Medium durchgeführt werden können, sind für eine vollständige Identifizierung biochemische und, falls indiziert, immunologische Tests unter Verwendung von Reinkulturen erforderlich.

Columbia-Agar-Basis weist einen relativ hohen Kohlenhydratanteil auf, wodurch beta-hämolytische Streptokokken eine grünliche hämolytische Reaktion hervorrufen können, die fälschlicherweise als alpha-Hämolyse interpretiert werden kann.

LITERATUR

1. Merlino, J., S. Siarakas, G. J. Robertson, G. R. Funnell, T. Gottlieb, and R. Bradbury. 1996. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. J. Clin. Microbiol. 34: 1788-1793.
2. Hengstler, K.A., R. Hammann, and A.-M. Fahr. 1997. Evaluation of BBL CHROMagar Orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. J. Clin. Microbiol. 35: 2773-2777.
3. Samra, Z., M. Heifetz, J. Talmor, E. Bain, and J. Bahar. 1998. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. J. Clin. Microbiol. 36: 990-994.

4. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:502-504.
5. MacFaddin, J. F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 269-275. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
6. Barry, A.L., P.B. Smith, and M. Turck. 1975. Cumitech 2, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., T.L. Gavan. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Forbes, B.A., and P.A. Granato. Processing specimens for bacteria. 1995. *In*: Murray, P. R., 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.
8. Clarridge, J.E., M.T. Pezzlo, and K.L. Vosti. 1987. Cumitech 2A, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Data on file. BD Diagnostic Systems Europe, Heidelberg, Germany.
11. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8thed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

REF 254489

Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

REF 257727

Gebrauchsfertige Plattenmedien, 120 Platten

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2019 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Schema 1: Richtlinien für das Erscheinungsbild von Kolonien, für die Leistung von Bestätigungstests und die daraus folgende Differenzierung oder Identifizierung auf BD CHROMagar Orientation Medium



