

BD BBL CHROMagar O157

Patent USA č. 6,165,743



*See footnote below

ÚČEL POUŽITÍ

BBL CHROMagar O157 je selektivní médium určené k izolaci, diferenciaci a pravděpodobné identifikaci *Escherichia coli* O157:H7 z klinických, potravinových, veterinárních a vnějších zdrojů.

BBL CHROMagar O157 bylo schváleno Výzkumným ústavem AOAC v rámci programu Performance Tested MethodsSM pro analýzu syrového mletého hovězího masa a nepasterizovaného jablečného moštu s použitím metod FDA BAM, USDA FSIS a ISO.¹⁻³

ZÁSADY A VYSVĚTLENÍ POSTUPU

Mikrobiologická metoda

E. coli O157:H7 je nejčastěji izolovaný patogen z krvavých stolic.⁴⁻⁶ Nicméně nepřítomnost krvavého průjmu nevylučuje výskyt *E. coli* O157:H7.⁷ Tento sérotyp způsobuje velkou řadu chorob od mírného nekrvavého průjmu až k závažnému krvavému průjmu (hemolytickou kolitidu), hemolytickému uremickému syndromu a smrti.⁴⁻⁶ Izolace *E. coli* O157:H7 je častější než izolace některých dalších obecných enterických patogenů, zejména *Shigella* v mnoha oblastech a věkových skupinách. Přenos nejčastěji probíhá požitím syrového nebo nedovařeného či nedopečeného hovězího masa; příčinou mohou být i jiné potraviny.⁴⁻⁶ Přenos může proběhnout i z člověka na člověka, stejně jako z rekreačních vodních zdrojů.⁴⁻⁶

CHROMagar O157 je určen k izolaci, diferenciaci a pravděpodobné identifikaci *E. coli* O157:H7. Díky chromogennímu substrátu v médiu mají kolonie *E. coli* O157:H7 světle fialové zbarvení, což umožňuje pravděpodobnou identifikaci na misce pro primární izolaci a diferenciaci od ostatních organismů. Ve vzorcích s malým množstvím *E. coli* O157:H7 může být před inokulací média vhodné použít namnožovací metody.

CHROMagar O157 vyvinul původně A. Rambach, CHROMagar, Paříž, Francie. Na základě licenční smlouvy společnost BD tento preparát zdokonalila s využitím autorsky chráněných postupů používaných při výrobě média na miskách **BBL CHROMagar O157**.

Výživné látky dodávají speciálně vybrané **Difco** peptony. Přidání teluričitanu draselného, cefiximu a cefsulodinu snižuje počet jiných bakterií, než je *E. coli* O157:H7, které se množí na tomto médiu. Směs chromogenů se skládá z umělých substrátů (chromogenů), které po hydrolýze pomocí specifického enzymu uvolňují nerozpustnou zabarvenou sloučeninu. *E. coli* O157:H7 používá jeden z chromogenních substrátů vytvářející světle fialové kolonie. Množení světle fialových kolonií se považuje za pravděpodobné pro *E. coli* O157:H7 u **BBL CHROMagar O157**. Jiné bakterie než je *E. coli* O157:H7 mohou využívat jiné chromogenní substráty vytvářející modře až modrozeleně zbarvené kolonie, nebo, pokud není použit žádný chromogenní substrát, mohou mít svoji vlastní přirozenou barvu. To usnadňuje zjištění a diferenciaci *E. coli* O157:H7 od jiných organismů.

*NEZÁVISLÉ ZKOUŠKY VZORKŮ TESTOVACÍ SADY TOHOTO TYPU, PROVEDENÉ AOAC RESEARCH INSTITUTE (VÝZKUMNÝM ÚSTAVEM AOAC), POTVRDILY, ŽE FUNKCE TESTOVACÍ SADY ODPOVÍDÁ ÚDAJŮM, KTERÉ VÝROBCE UVÁDÍ V PŘILOŽENÉM POPISU. VÝROBCE STVRZUJE, ŽE TATO SADA VE VŠECH OHLEDECH SPLŇUJE PARAMETRY, KTERÉ VÝZKUMNÝ ÚSTAV AOAC HODNOTIL TAK, JAK JE UVEDENO V OSVĚDČENÍ ČÍSLO 090501 PROGRAMU *Performance Tested Methods*.

ČINIDLA

BD CHROMagar O157 Medium (Médium BD CHROMagar O157)

Přibližné množství* na litr deionizované vody

Chromopepton	16,0 g
Chlorid sodný	7,0 g
Směs chromogenů	0,65 g
Teluričitan draselný	2,5 mg
Cefixim	0,05 mg
Cefsulodin	4,0 mg
Agar	14,0 g

pH: 7,1 ± 0,2

*Upraveno anebo doplněno dle požadavků tak, aby byla splněna kritéria výkonu.

DŮLEŽITÉ RADY

IVD . Pouze pro odborné použití.

Zjistíte-li nadměrnou vlhkost, položte obrácenou spodní část na sejmutou horní část a nechte na vzduchu vyschnout, aby se dolní a horní části misky při inkubaci vzduchotěsně nespojily. Při sušení chraňte před světlem. Viz **SKLADOVÁNÍ A ŽIVOTNOST**.

Nepoužívejte misky, které vykazují známky mikrobiální kontaminace, změny zabarvení, vysušení, popraskání nebo jiné známky poškození.

V klinických vzorcích mohou být přítomny patogenní mikroorganismy včetně virů hepatitidy a viru lidské imunodeficiency (HIV). Proto dodržujte při práci s veškerým materiálem kontaminovaným krví a jinými tělními tekutinami Standardní bezpečnostní opatření⁸⁻¹¹ a předpisy instituce.

Ve vzorcích potravy mohou být přítomny patogenní mikroorganismy, včetně *E. coli* O157.

Během všech kroků dodržujte postupy sterilizace a zavedená opatření proti mikrobiologickým rizikům.

Připravené misky, nádoby se vzorky a další kontaminované materiály je nutné po použití nejprve sterilizovat v autoklávu a poté zlikvidovat.

Pokyny pro aseptickou manipulaci, informace týkající se biologického nebezpečí a pokyny pro likvidaci použitého produktu naleznete v dokumentu **VŠEOBECNÉ POKYNY K POUŽITÍ**.

SKLADOVÁNÍ A ŽIVOTNOST

Po převzetí až do doby těsně před použitím skladujte misky v originálním obalu, v temnu a při teplotě 2 až 8 °C. Misky nesmí zmrznout nebo se přehřát. Otevřete až bezprostředně před použitím. Misky lze inokulovat až do data expirace (viz štítek na obalu) a inkubovat je lze po doporučenou dobu inkubace. Před inokulací počkejte, až se médium ohřeje na pokojovou teplotu.

Misky z otevřených sad po 10 kusech lze použít po dobu jednoho týdne, pokud jsou uloženy v čistém prostředí při teplotě 2 až 8 °C. **Před inkubací i během ní minimalizujte působení světla, protože může zničit chromogeny.**

KONTROLA JAKOSTI UŽIVATELEM

Zkontrolujte účinnost inokulací reprezentativního vzorku misek čistými kulturami stabilních kontrolních organismů, které vykazují známé požadované reakce (podrobné informace naleznete v dokumentu **VŠEOBECNÉ POKYNY K POUŽITÍ**). Jako testované kmeny jsou doporučeny kmeny z dále uvedené tabulky. Inkubujte aerobně po dobu 18 až 24 h při teplotě 35 ± 2 °C v temném prostředí.

Kmeny	Výsledky růstu
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728 (=NCTC 12900)	Uspokojivý až vynikající růst Kolonie šedofialové až růžovofialové (= světle fialové)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Částečná až úplná inhibice; kolonie modrozelené; mohou být obklopeny modrozelenými kruhy
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Růst: Modrozelené až modré kolonie
Slepý vzorek	Bezbarvé až světle béžové, průhledné

Požadavky na kontrolu kvality musí být splněny v souladu s platnými místními a státními zákony nebo požadavky na akreditaci a se standardními kontrolními postupy vaší laboratoře. Vhodné kontrolní postupy doporučujeme nastudovat z příslušných pokynů amerického úřadu pro klinické a laboratorní normy CLSI (dříve NCCLS).

POSTUP

Dodané materiály

BD CHROMagar O157 Medium (90 mm misky **Stacker**). Mikrobiologicky kontrolováno.

Potřebný materiál, který není součástí balení: Podle potřeby pomocná kultivační média, činidla, organismy pro kontrolu jakosti a další laboratorní vybavení.

Druhy vzorků

Podrobné informace o odběru vzorků a manipulaci s nimi v případě klinického využití naleznete v laboratorních postupech. Toto médium se používá k izolaci *Escherichia coli* O157:H7 ze vzorků stolice nebo rektálních výtěrů od pacientů s podezřením na infekci tímto kmenem. Při testování zemědělských produktů dodržujte příslušné standardní metody pro přípravu vzorku a zpracování podle typu vzorku a geografického umístění.

Viz také **VÝKONOVÉ CHARAKTERISTIKY A OMEZENÍ POSTUPU**.

Provedení testu

Dodržujte aseptické postupy. Povrch agarů by měl být hladký a vlhký, ale bez nadměrné vlhkosti. U klinických vzorků inokulujte co nejdříve po převzetí vzorku v laboratoři vzorek na misku s médiem **BBL CHROMagar O157** a proveďte nátěr k izolaci. Je-li vzorek kultivován přímo z výtěru, otřete výtěr jemně o malou plochu povrchu na okraji a poté proveďte rozočkování z tohoto místa pomocí kličky. Misky lze také inokulovat z předběžného namnožení. Obrácené misky (stranou s agarem nahoru) inkubujte v aerobních podmínkách 18–24 h při teplotě 35 ± 2 °C. Ke zjištění jiných enterických patogenů lze inokulovat i jiná média jako **BD MacConkey II Agar**.

U potravinových vzorků se podívejte na příslušné odkazy a dodržujte použitelné standardní metody. Inokulujte inkubovaný vzorek obohacené živné půdy nebo testovaný potravinový vzorek na misku s médiem **BBL CHROMagar O157** a proveďte nátěr k izolaci. Obrácené misky (stranou s agarem nahoru) inkubujte v aerobních podmínkách 18–24 h při teplotě 35 ± 2 °C.

Výsledky

Po správné inkubaci ohodnoťte misky proti bílému podkladu. *E. coli* O157:H7 vytváří na BD CHROMagar O157 Medium světle fialové kolonie. Všechny světle fialové kolonie musí být před vykázáním výsledku jako *E. coli* O157:H7 potvrzeny biochemickými a/nebo sérologickými testy.^{1,2,3,6} Grampozitivní organismy musí být zcela inhibovány. Jiné gramnegativní organismy než *E. coli* O157:H7 budou buď inhibovány, nebo vytvoří bezbarvé, modré, zelené, modrozelené (voda) nebo přirozeně zbarvené kolonie.

SPECIFICKÉ VLASTNOSTI ÚČINNOSTI A OMEZENÍ POSTUPU

Médium BD CHROMagar O157 je chromogenní médium určené k selektivní izolaci a pravděpodobné identifikaci kmenů *E. coli* O157:H7 z klinických, potravinových, veterinárních a vnějších zdrojů.

Výsledky účinnosti¹²

Klinické testování: V metropolitní nemocnici bylo hodnoceno celkem 110 zmrazených fekálních izolátů a 16 kultur stolice (10 čerstvých a 6 archivovaných) pomocí médií BBL CHROMagar O157, Sorbitol MacConkey (SMAC) a Sorbitol MacConkey s cefiximem a telluritem (SMAC-CT). Zmrazené fekální izoláty sestávaly z 50 *E. coli* O157:H7, 15 *E. coli* non-O157, 8 *E. coli* non-O157 pozitivních na toxiny Shiga a 37 dalších *Enterobacteriaceae* a nefermentujících gramnegativních tyčků. Sedm ze 16 testovaných vzorků stolice bylo pozitivních na *E. coli* O157:H7. Byly zjištěny následující hodnoty citlivosti a specifity:

	Citlivost (č.)	Specifická (č.)
BBL CHROMagar O157	98 % (56/57)	100 % (69/69)
SMAC	96 % (55/57)	80 % (55/69)
SMAC-CT	100 % (57/57)	93 % (64/69)

Testování zemědělských produktů

Médium BBL CHROMagar O157 bylo schváleno Výzkumným ústavem AOAC v rámci programu Performance Tested Methods.¹² **BBL CHROMagar O157** byl vyhodnocen ke zjišťování *E. coli* O157:H7 v syrovém mletém hovězím masu a nepasterizovaném jablečném moštu s použitím inokulovaných vzorků. Prokázání *E. coli* O157:H7 u **BBL CHROMagar O157** bylo porovnáváno s referenčním médiem na miskách podle FDA BAM, USDA FSIS a ISO. U referenčního média a **BBL CHROMagar O157** byly dodrženo namnožení a testovací postupy doporučené v referencích. Imunomagnetická separace (IMS) byla provedena podle metod USDA a ISO. Ze 180 testovaných potravinových vzorků bylo 45 testováno s použitím metod FDA BAM a USDA FSIS a 90 s použitím ISO metod. **BBL CHROMagar O157** vykázal 100 % citlivost a 100 % specifickost ve srovnání s referenčními metodami pro obě potravinové matrice. Při testování potravinových matic nebyly zjištěny žádné falešně negativní výsledky. Nebyl zjištěn žádný statistický rozdíl při prokazování pomocí metody **BBL CHROMagar O157** ve srovnání s referenčním médiem na misce s použitím Chi-square analýzy. Známé izoláty, včetně 54 kmenů *E. coli* O157:H7 (3 z nich byly nepohyblivé kmeny) a 32 kmenů non-*E. coli* O157:H7, byly s **BBL CHROMagar O157** vyhodnoceny s citlivostí a specifickostí v hodnotě 100 %. Výsledky těchto studií ukazují, že **BBL CHROMagar O157** je účinné médium pro prokázání a zjištění *E. coli* O157:H7 v syrovém mletém hovězím masu a nepasterizovaném jablečném moštu s použitím metod FDA BAM, USDA FSIS a ISO. V tabulce 1 najdete souhrn výsledků srovnávací studie validačních metod

Tabulka 1: Souhrn výsledků srovnání validačních metod

Potravinová matrice	Metoda	Množství inokula	Vzorky celkem	Celkem pozitivní	Referenční pozitivní	CHROMagar O157 pozitivní	Shoda metody ¹	Chi-Square ³
Syrové mleté hovězí	USDA hovězí	vysoké	20	15	12	15	85 % ²	1.33
		nízké	20	13	10	13	85 % ²	1.33
		kontrola	5	0	0	0	-	-
Syrové mleté hovězí	ISO hovězí	vysoké	20	17	16	17	95 % ²	0.00
		nízké	20	10	9	10	95 % ²	0.00
		kontrola	5	0	0	0	-	-
Nepasterizovaný jablečný mošt	ISO jablečný mošt	vysoké	20	19	19	19	100 %	0.00
		nízké	20	14	14	14	100 %	0.00
		kontrola	5	0	0	0	-	-
Nepasterizovaný jablečný mošt	FDA jablečný mošt	vysoké	20	13	13	13	100 %	0.00
		nízké	20	10	10	10	100 %	0.00
		kontrola	5	0	0	0	-	-

¹ Představuje procentuální podíl z potvrzených pozitivních a negativních vzorků, kombinovaných, které byly stejné u referenční metody a **BBL CHROMagar O157** metody.

² Další pozitivní vzorky zjištěné metodou **BBL CHROMagar O157**: 3 další pozitivní vzorky při testování syrového mletého hovězí metodou USDA/FSIS a 1 další pozitivní při testování syrového mletého hovězí metodou ISO.

³ Hodnoty Chi-square < 3,84 nevykazují žádný výrazný rozdíl při p<0,05.

Omezení postupu

BBL CHROMagar O157 nezjistí enterohemorragické nebo enteropathogenní sérotypy *E. coli* jiné než O157:H7, protože se mohou lišit biochemicky. β -glukuronidáza pozitivní kmeny *E. coli* O157:H7 se pomocí **BBL CHROMagar O157** nezjistí; tyto kmeny jsou ale vzácné.

BBL CHROMagar O157 nerozlišuje mezi kmeny *E. coli* O157:H7 produkujícími a neprodukcujícími toxin.

Jiné organismy než *E. coli* O157:H7, jako *Proteus* spp. se mohou v tomto médiu množit; obvykle se ale vyznačují jinou barvou. Jestliže zjistíte neizolované světle fialové kolonie, můžete dosáhnout izolace subkulturací na jiné **BBL CHROMagar O157** misce. Byly objeveny vzácné kmeny *E. coli* (biochemicky podobné typu *Shigella*), které vytvářejí falešně pozitivní výsledky při použití **BBL CHROMagar O157**. Inkubace při nižších než doporučených teplotách může zdržet

zjištění pozitivních reakcí. Pokud je inkubační teplota pod $35 \pm 2^\circ\text{C}$, musí být misky inkubovány celých 24 h před vykázáním výsledku jako negativního. 12
Ke konečné identifikaci je nutné provést ověřovací testy. 1-3,6
Toto médium se nesmí používat pro izolaci jiných enterických patogenů, než je *E. coli* O157:H7.

LITERATURA

1. U.S. Food and Drug Administration. 2002. Bacteriological analytical manual (online), Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. AOAC International, Gaithersburg, MD.
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
2. U. S. Department of Agriculture. 2002. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) from meat products. In Microbiology laboratory guidebook MLG 5.03.
3. International Organization for Standards (ISO) Microbiological Methods, ISO 16654: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157, First Edition, 2001-05-01.
4. Moe, C. 2002. Waterborne transmission of infectious agents. In C. Hurst, R. Crawford, G. Knudsen, M. McInerney, and L. Stetzenbach (eds.), Manual of environmental microbiology, 2 nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. Doyle, M., T. Zhao, J. Meng, and S. Zhao. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. In M. Doyle, L. Beuchat, and T. Montville (eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology, Washington, DC.
6. Bopp, C.A., F.W. Brenner, P.I. Fields, J.G. Wells, and N.A. Strockbine. 2003. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, J.H. Jorgensen and R.H. Tenover (eds.), Manual of clinical microbiology. 8 th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
7. CDC MMWR Jan 26, 2001/50 (RR02): 1-69. Diagnosis and management of foodborne illness.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. 2 nd ed., NCCLS, Wayne, Pa.
9. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
10. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HIHS Publication (CDC), 4 th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
11. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
12. Data on file, BD Diagnostic Systems.

BALENÍ/DOSTUPNOST

Médium BD CHROMagar O157

Kat. č. 254105

Médium na miskách k okamžitému použití, 20 kusů v balení

DALŠÍ INFORMACE

Další informace získáte u nejbližšího zástupce BD.



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>

AOAC is a trademark and Performance Tested Methods is a service mark of AOAC International.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.
Difco is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.
BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
© 2006 BD.