

BD BBL CHROMagar O157

U.S. Patent Nr. 6.165.743



*See footnote below

VERWENDUNGSZWECK

BBL CHROMagar O157 ist ein Medium zur selektiven Isolierung, Differenzierung und präsumtiven Identifizierung von *Escherichia coli* O157:H7 aus klinischen und veterinärmedizinischen Quellen, sowie aus Nahrungsmitteln und Umweltquellen.

BBL CHROMagar O157 wurde mit dem Performance Tested MethodsSM Program zur Analyse von rohem Rinderhack und nicht pasteurisiertem Apfelwein des amerikanischen AOAC Research Institute unter Verwendung der FDA BAM-, USDA FSIS- und ISO-Methoden validiert.¹⁻³

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

E. coli O157:H7 ist der am häufigsten aus blutigen Stuhlproben isolierte Krankheitserreger.⁴⁻⁶ Das Fehlen blutig-wässriger Stuhlgänge schließt allerdings die Anwesenheit von *E. coli* O157:H7 nicht aus.⁷ Dieser Serotyp verursacht ein breites Spektrum von Erkrankungen von leichten, nicht blutigen Durchfällen bis hin zu starken blutig-wässrigen Stuhlgängen (hämolytische Colitis), hämolytisch urämischem Syndrom und Tod.⁴⁻⁶ Die Isolierung von *E. coli* O157:H7 überschreitet in vielen Gebieten und Altersgruppen die einiger anderer, häufig vorkommender pathogener Darmbakterien, insbesondere *Shigella*. Die Übertragung findet am häufigsten durch Aufnahme von rohem oder nur kurz gebratenem/gekochtem Rindfleisch statt, es wurden auch andere Nahrungsmittel als Ursache genannt.⁴⁻⁶ Darüber hinaus kann die Übertragung auch von Mensch zu Mensch, sowie durch schlechte Wasserqualität in Schwimmbädern erfolgen.⁴⁻⁶

CHROMagar O157 ist zur Isolierung, Differenzierung und präsumtiver Identifizierung von *E. coli* O157:H7 bestimmt. Aufgrund der chromogenen Substrate in dem Medium bilden die *E. coli* O157:H7 hellviolette Kolonien und gestatten so eine präsumtive Identifizierung aus der Primärisolierungsplatte und Differenzierung von anderen Organismen. Bei Proben mit nur geringen Mengen an *E. coli* O157:H7 können sich vor Inokulieren des Mediums Anreicherungsmethoden als hilfreich erweisen.

CHROMagar O157 wurde ursprünglich durch A. Rambach, CHROMagar, Paris (Frankreich) entwickelt. BD hat unter einem Lizenzabkommen diese Rezeptur unter Verwenden des Urheberrechts, das bei der Herstellung des **BBL CHROMagar O157** vorbereiteten Plattenmediums gebraucht wird, optimiert.

Speziell ausgewählte **Difco** Peptone liefern die Nährstoffe. Die Zugabe von Kaliumtellurit, Cefixim und Cefsulodin reduzieren neben *E. coli* O157:H7 die Anzahl an Bakterien, die auf diesem Medium wachsen. Die Chromogenmischung besteht aus künstlichen Substraten (Chromogenen), die bei der Hydrolisierung durch spezifische Enzyme eine nicht lösliche farbige Verbindung freisetzen. *E. coli* O157:H7 nutzt eines der chromogenen Substrate und bildet hellviolette Kolonien. Das Wachstum hellvioletter Kolonien gilt für *E. coli* O157:H7 auf **BBL**

*VOM HERSTELLER ZUR VERFÜGUNG GESTELLTE PROBEN DIESES TESTKIT-MODELLS WURDEN UNABHÄNGIG DURCH DAS AOAC RESEARCH INSTITUTE EVALUIERT, DABEI WURDE FESTGESTELLT; DASS DIE LEISTUNG DEN SPEZIFIKATIONEN DES HERSTELLERS WIE AUF DER GEBRAUCHSANWEISUNG DES TESTKITS ANGEGEBEN ENTSPRICHT. DER HERSTELLER BESCHEINIGT; DASS DIESES KIT IN JEDER HINSICHT MIT DEN SPEZIFIKATIONEN; DIE URSPRÜNGLICH DURCH DAS AOAC RESEARCH INSTITUTE EVALUIERT WURDEN WIE IN *Performance Tested Methods* ZERTIFIKAT NR. 090501 GENAU BESCHRIEBEN; KONFORM GEHEN.

CHROMagar O157 als präsumtiv. Nicht *E. coli* O157:H7 Bakterien nutzen andere chromogene Substrate, die blaue bis blaugüne Kolonien ergeben oder die Kolonien erscheinen, wenn keine der chromogenen Substrate verwertet werden, in ihrer natürlichen Farbe. Das erleichtert den Nachweis und die Differenzierung von *E. coli* O157:H7 von anderen Organismen.

REAGENZIEN

BD CHROMagar O157 Medium

Ungefähre Zusammensetzung* pro Liter destilliertem Wasser

Chromopepton	16,0 g
Natriumchlorid	7,0 g
Chromogenmischung	0,65 g
Kalium-Tellurit	2,5 mg
Cefixim	0,05 mg
Cefsulodin	4,0 mg
Agar	14,0 g

pH: 7,1 ± 0,2

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur zum gewerblichen Gebrauch vorgesehen.

Bei übermäßiger Feuchtigkeit das Unterteil der Platte nach oben drehen, versetzt auf den Deckel legen und an der Luft trocknen lassen, um zu verhindern, dass sich während der Inkubation Deckel und Unterteil aneinander festsaugen. Während des Trocknens vor Licht schützen. Siehe **LAGERUNG UND HALTBARKEIT**.

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

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“⁸⁻¹¹ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Pathogene Mikroorganismen einschließlich *E. coli* O157 können in Nahrungsmittelproben vorkommen. Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise und der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen erfolgen. Gebrauchsfertige Platten, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach der Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

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

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

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

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

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Zur Leistungsprüfung repräsentative Platten mit Reinkulturen stabiler Kontrollorganismen inokulieren, welche bekannte, gewünschte Reaktionen bewirken (für nähere Angaben siehe **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNGEN**). Es werden die in der Tabelle unten angegebenen Teststämme empfohlen. Platten aerob für 18 bis 24 h bei 35 ± 2° C im Dunkeln inkubieren.

Stämme	Wachstum
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728 (=NCTC 12900)	Mittleres bis sehr gutes Wachstum. Kolonien grau-violett bis rosa-violett (=hellviolett)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Teilweise bis vollständig gehemmtes Wachstum; blau-grüne Kolonien; möglicherweise umgeben von blau-grünen Höfen
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Wachstum: blau-grüne bis blaue Kolonien:
Nicht inokuliert	Farblos bis hell beigefarben, transparent

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie der Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Klinischen Anwendern wird geraten, sich über geeignete Maßnahmen zur Qualitätskontrolle an die einschlägigen Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (ehemals NCCLS) zu halten.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD CHROMagar O157 Medium (90 mm **Stacker**-Platten). Mikrobiologisch kontrolliert.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Material: Nach Bedarf zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und andere Laborgeräte.

Probenarten

Zur klinischen Verwendung siehe Laborvorschriften zur Entnahme und Handhabung von Proben. Diese Medium wird zur Isolierung von *Escherichia coli* O157:H7 aus Stuhlproben oder Rektalabstrichen von Patienten verwendet, die mit diesem Agens infiziert sind. Zum Nachweis in Nahrungsmittelproben die geeigneten Standardmethoden bezüglich Probenvorbereitung und Verarbeitung gemäß Probenart und geografischer Lage anwenden. Siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**.

Testverfahren

Aseptisch vorgehen. Die Agaroberfläche sollte glatt und feucht sein, jedoch keine überschüssige Feuchtigkeit aufweisen.

Die klinischen Proben so bald wie möglich nach Eingang im Labor auf einer **BBL CHROMagar O157** inokulieren und zum Isolieren ausstreichen. Falls die Probe direkt von einem Tupfer kultiviert wird, Tupfer über einen kleinen Bereich am Rand der Oberfläche rollen und anschließend aus diesem Bereich mit einer Öse ausstreichen. Alternativ können die Platten aus Voranreicherungen inokuliert werden. Platten aerob in umgekehrter Position (Agarseite nach oben) bei 35 ± 2 °C für 18–24 h inkubieren. Es können auch andere Medien wie **BD MacConkey II Agar** inokuliert werden, um andere pathogene Darmbakterien nachzuweisen.

Für Nahrungsmittelproben siehe entsprechende Literaturhinweise und den geeigneten Standardmethoden folgen. Inkubierte Anreicherungsbouillon oder Partikel gescreenter Nahrungsmittelprobe auf **BBL CHROMagar O157** inokulieren und zur Isolierung ausstreichen. Platten aerob in umgekehrter Position (Agarseite nach oben) bei 35 ± 2 °C für 18–24 h inkubieren.

Ergebnisse

Platten nach angemessener Inkubation vor einem weißen Hintergrund ablesen. *E. coli* O157:H7 bildet auf **BBL CHROMagar O157**-Medium hellviolette Kolonien. Alle hellvioletten Kolonien müssen vor der Interpretation als *E. coli* O157:H7 mit biochemischen und/oder serologischen Methoden bestätigt werden.^{1,2,3,6} Wachstum gram-positiver Organismen vollständig hemmen. Gram-negative Organismen außer *E. coli* O157:H7 werden entweder gehemmt oder bilden farblose, blaue, grüne, blau-grüne (wassergrün) oder natürlich gefärbte Kolonien.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD CHROMagar O157 ist ein chromogenes Medium zur selektiven Isolierung und präsumtiven Identifizierung von *E. coli* O157:H7 aus klinischen und veterinärmedizinische Quellen, sowie aus Nahrungsmitteln und Umweltquellen.

Leistungsergebnisse¹²

Klinische Tests: Insgesamt 110 tiefgefrorene Fäkalisolate und 16 Stuhlkulturen (10 frische und 6 gelagerte) wurden an einem großen städtischen Krankenhaus mit BBL CHROMagar O157, Sorbitol MacConkey (SMAC) und Sorbitol MacConkey mit Cefixim und Tellurit (SMAC-CT) bewertet. Die tiefgefrorenen Fäkalisolate bestanden aus 50 *E. coli* O157:H7, 15 *E. coli* non-O157, 8 Shiga-toxin positiven *E. coli* non-O157 und 37 anderen *Enterobacteriaceae* und nicht fermentativen gram-negativen Stäbchen. Sieben der 16 getesteten Stuhlproben waren für *E. coli* O157:H7 positiv. Die folgenden Empfindlichkeiten und Spezifitäten wurden beobachtet:

	Empfindlichkeit (Nr.)	Spezifität (Nr.)
BBL CHROMagar O157	98 % (56/57)	100 % (69/69)
SMAC	96 % (55/57)	80 % (55/69)
SMAC-CT	100 % (57/57)	93 % (64/69)

Lebensmitteltests

BBL CHROMagar O157 wurde durch das AOAC Research Institute mit dem Performance Tested Methods Program validiert.¹² **BBL CHROMagar O157** wurde für den Nachweis von *E. coli* O157:H7 in rohem Rinderhack und nicht pasteurisiertem Apfelwein unter Verwendung von Proben mit Zuwaage evaluiert. Die Isolierung von *E. coli* O157:H7 auf **BBL CHROMagar O157** wurde mit den FDA BAM-, USDA FSIS- und ISO-Referenzplattenmedien verglichen. Die für die Referenz erforderlichen Anreicherungs- und Screeningverfahren wurden für das Referenzmedium und **BBL CHROMagar O157** eingehalten. Es wurde gemäß USDA- und ISO-Methoden eine immunmagnetische Trennung (immunomagnetic separation = IMS) durchgeführt. Von den 180 getesteten Nahrungsmittelproben wurden 45 nach FDA BAM- und USDA FSIS-Methoden und 90 nach ISO-Methoden untersucht. **BBL CHROMagar O157** ergab verglichen mit den Referenzmethoden für beide Nahrungsmittelgrundsubstanzen eine Empfindlichkeit sowie eine Spezifität von je 100 %. Die Untersuchung der Nahrungsmittelgrundsubstanzen ergab keine falsch negativen Ergebnisse. In der Isolierung mit der **BBL CHROMagar O157**-Methode konnte verglichen mit den Referenzplattenmedien mit der Chi-Quadrat-Analyse statistisch kein Unterschied nachgewiesen werden. Bekannte Isolate (einschließlich 54 *E. coli* O157:H7-Stämme - 3 davon waren Non-Motilitätsstämme - und 32 non-*E. coli* O157:H7-Stämme) wurden auf **BBL CHROMagar O157** mit einer Empfindlichkeit und Spezifität von 100 % bewertet. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass **BBL CHROMagar O157** für die Isolierung und den Nachweis von *E. coli* O157:H7 in rohem Rinderhack und nicht pasteurisiertem Apfelwein mit FDA BAM-, USDA FSIS- und ISO-Methoden ein effektives Medium ist. Für eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Vergleichsstudie von Validierungsmethoden siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des Vergleichs der Validierungsmethoden

Nahrungsmittelgrundsubstanz	Methode	Inoculum-Niveau	Proben, gesamt	Positive, gesamt	Positive, Referenz	CHROMagar O157 Positive	Methoden-übereinstimmung	Chi-Quadrat
Rohes Rinderhack	USDA Rind	Hoch	20	15	12	15	85 % ²	1,33
		Niedrig	20	13	10	13	85 % ²	1,33
		Kontrolle	5	0	0	0	-	-
Rohes Rinderhack	ISO Rind	Hoch	20	17	16	17	95 % ²	0,00
		Niedrig	20	10	9	10	95 % ²	0,00
		Kontrolle	5	0	0	0	-	-
Nicht pasteurisierter Apfelwein	ISO Apfelwein	Hoch	20	19	19	19	100 %	0,00
		Niedrig	20	14	14	14	100 %	0,00
		Kontrolle	5	0	0	0	-	-
Nicht pasteurisierter Apfelwein	FDA Apfelwein	Hoch	20	13	13	13	100 %	0,00
		Niedrig	20	10	10	10	100 %	0,00
		Kontrolle	5	0	0	0	-	-

¹ Gibt zusammen die Prozentzahl der bestätigt positiven und negativen Proben an, die zwischen der Referenz- und **BBL CHROMagar O157**-Methode vergleichbar waren.

² Zusätzliche, durch die **BBL CHROMagar O157**-Methode nachgewiesenen, positive Proben: 3 zusätzlich Positive bei der Untersuchung von rohem Rinderhack mit der USDA/FSIS-Methode und 1 zusätzlich Positive bei der Untersuchung von rohem Rinderhack mit der ISO-Methode.

³ Chi-Quadrat-Werte von < 3,84 zeigen bei p < 0,05 keinen signifikanten Unterschied.

Verfahrensbeschränkungen

BBL CHROMagar O157 weist keine enterohämorrhagischen oder enteropathogenen Serotypen von *E. coli* außer O157:H7 nach, da sich biochemisch unterschiedlich sein können. Es werden auf dem **BBL CHROMagar O157** keine β -Glucuronidase-positive *E. coli* O157:H7-Stämme nachgewiesen. Diese Stämme sind allerdings selten.

BBL CHROMagar O157 differenziert nicht zwischen Toxin produzierenden und nicht-produzierenden Stämmen von *E. coli* O157:H7.

Andere Organismen außer *E. coli* O157:H7 (wie z. B. *Proteus* spp.) können auf diesem Medium wachsen, produzieren aber im Allgemeinen eine andere Farbe. Bei Feststellen nicht isolierter hellvioletter Kolonien kann Isolierung durch Subkultivierung auf eine andere **BBL CHROMagar O157**-Platte erreicht werden. Es wurden seltene *E. coli*-Stämme (biochemisch *Shigella* ähnlich) gefunden, die auf **BBL CHROMagar O157** falsch positive Ergebnisse ergeben. Eine Inkubation unter den empfohlenen Temperaturen kann den Nachweis positiver Reaktionen verzögern. Bei Inkubationstemperaturen unter 35 ± 2 °C sind die Platten ganze 24 Stunden zu inkubieren, bevor ein negatives Ergebnis herausgegeben wird.¹²

Zur definitiven Identifizierung sind Bestätigungstests erforderlich.^{1-3,6}

Dieses Medium darf nicht zur Isolierung pathogener Darmbakterien außer *E. coli* O157:H7 verwendet werden.

LITERATUR

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, 2nd 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. 8th 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. 2nd 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, HHS Publication (CDC), 4th 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.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD CHROMagar O157 Medium

Best.-Nr. 254105

Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

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>

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.