

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)

VERWENDUNGSZWECK

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) (Modifizierter DCLS-Agar / Hektoen-Enteroagar (Doppelplatte) wird zur Isolierung von *Salmonella* und *Shigella* aus menschlichen Fäkalproben verwendet.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

Modifizierter DCLS-Agar ist eine modifizierte Form des von Leifson beschriebenen Desoxycholat-Citrat-Agars.¹ Das Wachstum koliformer Organismen mit der Fähigkeit zur Lactose- oder Saccharose-Fermentierung wird im Allgemeinen gehemmt. Grampositive Bakterien werden unterdrückt. Während der Untersuchung von enterischen Erregern auf einem Endo-Medium haben Holt-Harris und Teague Lactose und Saccharose für die Entwicklung eines nährstoffreichen Agars mit Methyleneblau und Eosin verwendet. Einige koliforme Bakterien fermentieren eher Saccharose als Lactose.² Der Zusatz von Saccharose ermöglicht es nicht-pathogenen Saccharosefermentern rosarote (pinkfarbene), einfach zu erkennende Kolonien zu produzieren, was die Anzahl der falsch-positiven Reaktionen verringert.

Es gibt verschiedene Modifikationen der ursprünglichen DCLS-Agar-Rezeptur.^{3,4} Die Zusammensetzung dieses Mediums beinhaltet mehr Lactose und Saccharose und weniger Citrat und unterstützt deshalb das Wachstum von *Shigella* etwas besser als regulärer DCLS-Agar. Zusätzlich erlaubt es den Nachweis von *Yersinia enterocolitica*.

In modifiziertem DCLS-Agar liefern Fleischextrakt und Pepton den Stickstoff, während der Hefeextrakt für die Vitamine sorgt. Lactose und Saccharose sind fermentierbare Kohlehydrate, welche von vielen nicht-pathogenen, gramnegativen Stäbchen, wie z.B. *Escherichia coli*, verwendet werden, nicht aber von *Salmonella* und *Shigella*. Natriumcitrat, Natriumthiosulfat und Natriumdesoxycholat sind selektive Stoffe. Neutralrot wirkt als pH-Indikator.

Hektoen-Enteroagar (HEA) wurde 1967 von King und Metzger am Hektoen Institut mit dem Ziel entwickelt, die Isolierung von *Shigella*- und *Salmonella*-Organismen im Vergleich zu anderen damals häufig verwendeten Medien zu verbessern.⁵ Dieses Medium wird als mäßig selektiv eingestuft und ist insbesondere zur Isolierung von *Shigella*-Spezies geeignet. Die aktuelle Zusammensetzung unterscheidet sich von der ursprünglichen Substanz dadurch, dass Natrium-Desoxycholat eliminiert und die Konzentration der Gallensalze reduziert wurde. Zusätzlich wurde die Peptonkonzentration erhöht, um die hemmende Wirkung der Gallensalze auszugleichen.³

Durch die Gallensalze ist das Medium selektiv, hemmt grampositive Organismen und reduziert das Wachstum einiger gramnegativer Bakterien mit Ausnahme von *Salmonella* und *Shigella*. Lactose, Saccharose und Salizin sind zum Zweck der optimalen Differenzierung anhand der Farbe der Kolonien und des daran angrenzenden Mediums enthalten. Diese Kohlenstoffverbindungen werden nicht durch *Salmonella* und *Shigella* fermentiert, so dass keine Farbveränderung des pH-Indikatorsystems hervorgerufen wird, während Organismen, die eine oder mehrere dieser Verbindungen zu Säuren fermentieren, z.B. *E. coli*, zu einer Veränderung der Färbung nach gelb, orange oder lachsfarben führen. Ammoniumeisen (III)-Citrat und Natriumthiosulfat im Medium ermöglichen den Nachweis der Hydrogensulfid-Produktion von *Salmonella*. Das pH-Indikatorsystem besteht aus saurem Fuchsin und Bromthymolblau. Diese Rezeptur wird als eines von mehreren Plattenmedien zur Kultivierung von *Enterobacteriaceae* aus Stuhlproben empfohlen.⁶⁻⁸

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) ist eine Kombination von zwei selektiven Differenzierungsmedien zur Isolierung von *Salmonella* und *Shigella* aus menschlichen Fäkalien.

REAGENZIEN

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)

Zusammensetzungen* pro Liter destilliertem Wasser

DCLS Agar, Modified		Hektoen-Enteroagar	
Fleischpepton (pankreatisch)	5,0 g	Peptisch abgebautes Tiergewebe	12,0 g
Hefeextrakt	2,5	Hefeextrakt	3,0
Fleischextrakt	2,5	Gallensalze	9,0
Lactose	10,0	Lactose	12,0
Saccharose	10,0	Saccharose	12,0
Ammonium Eisen (III)-Citrat	1,0	Salizin	2,0
Natriumdesoxycholat	2,5	Natriumchlorid	5,0
Natriumthiosulfat	5,0	Natriumthiosulfat	5,0
Natriumcitrat	1,0	Ammonium Eisen (III)-Citrat	1,5
Neutralrot	0,02	Bromthymolblau	0,064
Agar	10,0	Fuchsin, sauer	0,1
pH 7,5 ± 0,2		Agar	13,5
		pH 7,6 ± 0,2	

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch.

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

Hinweise zur aseptischen Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des 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 Stapeln mit jeweils 10 Platten können bei Lagerung in einem sauberen Bereich bei 2 – 8 °C bis zu einer Woche verwendet werden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Repräsentative Proben mit den nachfolgend aufgeführten Stämmen inokulieren (detaillierte Informationen siehe **ALLGEMEINE GEBRAUCHSANLEITUNG**). Platten bei 35 ± 2 °C aerob inkubieren. *Shigella*-Spezies können gelegentlich eine Inkubationszeit von 42 – 48 h benötigen. Platten nach 18 – 24 h, sowie nach 42 - 48 h auf Wachstum, Koloniegröße, Pigmentierung und Selektivität überprüfen.

Stämme	DCLS Agar, Modified	Hektoen-Enteroagar
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Kein bis mäßiges Wachstum; rosarote (pinkfarbene) Kolonien, u.U. umgeben von Präzipitaten	Teilweise bis vollständig gehemmtes Wachstum; gelb-orangefarbene Kolonien, u.U. umgeben von Präzipitaten, lachsfarbene bis orangefarbene Höfe
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Vollständig gehemmtes Wachstum	Teilweise bis vollständig gehemmtes Wachstum; winzige, gelbe Kolonien, lachsfarbene bis orangefarbene Höfe
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Orange-rote Kolonien; mäßiges bis gutes Wachstum	Blau-grün bis blau mit schwarzen Zentren.
<i>Salmonella Abony</i> DSM 4224	Orange-rote bis gelbe Kolonien; gutes bis sehr gutes Wachstum	Gutes bis sehr gutes Wachstum; grüne bis blau-grüne Kolonien mit schwarzem Zentrum
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Orange-rote bis gelbe Kolonien; gutes bis sehr gutes Wachstum	Gutes bis sehr gutes Wachstum; grüne bis blau-grüne Kolonien mit schwarzem Zentrum
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Orange-rote bis gelbe Kolonien; gutes bis sehr gutes Wachstum	Gutes bis sehr gutes Wachstum; hellgrüne Kolonien
Nicht inokuliert	Orangerot, leicht opaleszierend	Grün, nahezu transparent

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (90 mm **Stacker**-Doppelplatten).
Mikrobiologisch kontrolliert.

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten

Dieses Medium wird für Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf bakterielle Darminfektionen und ähnliche Materialien, z.B. Rektalabstriche, verwendet (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**).^{7,8}

Testverfahren

Probe möglichst bald nach Eingang im Labor auf beiden Medien dieser Doppelplatte ausstreichen. Diese Platte wird hauptsächlich zur Isolierung von Reinkulturen aus Proben mit einer gemischten Flora verwendet. Falls das Material direkt von einem Tupfer kultiviert wird, Tupfer über einen kleinen Bereich an den Rändern der Oberfläche rollen; anschließend zur Isolierung aus diesen inokulierten Flächen ausstreichen.

Ein weniger selektives Medium (z.B. **BD MacConkey II Agar**) und selektive flüssige Anreicherungsmedien (z.B. Selenit-F-Bouillon) sollten ebenfalls inokuliert werden, um die Wahrscheinlichkeit der Isolierung bei einer geringen Population von gramnegativen Organismen zu erhöhen und den Nachweis anderer in der Probe vorhandener Organismen zu gewährleisten. Eine umfassende Abhandlung der Isolierung und Identifizierung von intestinalen Krankheitserregern aus klinischen Proben enthalten die Verfahrensanweisungen der entsprechenden Literatur.⁶⁻⁸

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) kann als Medium zur Subkultivierung aus Selenit-F-Bouillon verwendet werden.

Platten lichtgeschützt 18 – 24 h bei 35 ± 2 °C inkubieren. Bei negativem Ergebnis weitere 18 – 24 h inkubieren.

Ergebnisse

Wachstum auf **BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)** weist typischerweise das folgende Erscheinungsbild auf:

Organismen	DCLS Agar, Modified	Hektoen-Enteroagar
<i>E. coli</i>	Groß, eben, rosa bis rot mit Zone von Galle-Präzipitaten	Groß, gelb bis lachsfarben; u.U. gehemmtes Wachstum einiger Stämme
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Groß, mukoid, pinkfarben	Groß, gelb bis lachsfarben
<i>Proteus</i>	Farblos bis rot	Unterschiedlich, blaugrün bis blau oder lachsfarben; die meisten Stämme weisen ein schwarzes Zentrum auf
<i>Salmonella</i>	Farblos bis blassrosa	Blau-grün bis blau; die meisten Stämme weisen ein schwarzes Zentrum auf
<i>Shigella</i>	Farblos bis blassrosa	Grün und feucht, erhaben
<i>Pseudomonas</i>	Farblos bis braun oder grün	Unregelmäßig, grün bis braun
Grampositiv	Kein Wachstum	Kein bis leichtes Wachstum

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate) wird zur Isolierung von *Salmonella* und *Shigella* aus menschlichen Stuhlproben und Rektalabstrichen verwendet.^{3,6-9}

Wenn die Anzahl der Erreger in einer Probe niedrig ist, könnten sie auf hochselektiven Medien übersehen werden. Die gleichzeitige Inokulierung eines Mediums mit niedrigerer Selektivität wird empfohlen, z.B. **BD MacConkey II Agar** und/oder eine selektive Flüssiganreicherung.⁶⁻⁸

Das Aussehen von *Proteus mirabilis*-Kolonien kann auf diesem Medium dem von *Salmonella* ähneln.

Bestimmte *Shigella*-Stämme erfordern eine Inkubationszeit von 42 – 48 h.

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

Vermutete *Salmonella*- oder *Shigella*-Kolonien müssen biochemisch bestätigt und serologisch identifiziert werden.⁶

Da die Nährstoffanforderungen von Organismen variieren, können einige Stämme auf diesem Medium kein oder nur ein schwaches Wachstum zeigen.

LITERATUR

1. Leifson, E. 1935. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. J. Pathol. Bacteriol. 40:581-599.
2. Holt-Harris, J. E., and O. Teague. 1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. J. Infect. Dis. 18:596-601.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria. vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Hajna, A. A., and S. R. Damon. 1956. New enrichment and plating medium for the isolation of *Salmonella* and *Shigella* organisms. Appl. Microbiol. 4: 341.
5. King, S., and W.I. Metzger. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen enteric agar. Appl. Microbiol. 16:577-578.
6. Bopp, C.A., Brenner, F.W., Fields, P.I., Wells, J.G., and N.A. Strockbine. 2003. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Clinical microbiology procedures handbook, vol.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Kist, M., et al. 2000. Infektionen des Darmes. In: Mauch, H., Lüttiken, R., and S. Gatermann (eds.): MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 9. Urban & Fischer, Munich, Germany.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)

Best.-Nr. 254553

Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



BD Diagnostic Systems

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

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

Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe

Becton Dickinson France SA

11 rue Aristide Bergès

38800 Le Pont de Claix/France

Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD, BD logo and Stacker are trademarks of Becton, Dickinson and Company.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2003 Becton, Dickinson and Company