



BD BBL CHROMagar O157

Brevetto U.S.A. N° 6.165.743



*See footnote below

USO PREVISTO

BBL CHROMagar O157 è un terreno selettivo per l'isolamento, la differenziazione e l'identificazione presuntiva di *Escherichia coli* O157:H7 da fonti cliniche, alimentari, veterinarie e ambientali.

BBL CHROMagar O157 è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods per l'analisi di carne macinata di manzo cruda e succo di mela non pastorizzato con l'impiego delle metodiche FDA BAM, USDA FSIS e ISO.¹⁻³

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodica microbiologica.

E. coli O157:H7 è l'agente patogeno più frequentemente isolato da feci ematiche.⁴⁻⁶ L'assenza di diarrea ematica non esclude tuttavia la presenza di *E. coli* O157:H7.⁷ Questo sierotipo causa un'ampia gamma di malattie, da diarrea non ematica lieve a diarrea ematica grave (colite emolitica), sindrome uremico-emolitica e morte.⁴⁻⁶ L'isolamento di *E. coli* O157:H7 supera quello di alcuni altri comuni patogeni enterici, specialmente *Shigella*, in numerose aree e gruppi di età. La trasmissione si verifica con maggiore frequenza per ingestione di carne di manzo cruda o poco cotta, sebbene anche altri alimenti possano esservi implicati.⁴⁻⁶ La trasmissione può inoltre verificarsi da una persona all'altra, nonché tramite fonti d'acqua ricreative.⁴⁻⁶

CHROMagar O157 è destinato all'isolamento, alla differenziazione e all'identificazione presuntiva di *E. coli* O157:H7. Grazie alla presenza di substrati cromogeni nel terreno, le colonie di *E. coli* O157:H7 sviluppano una colorazione malva, consentendo in tal modo l'identificazione presuntiva dalla piastra di isolamento primario e la differenziazione da altri microrganismi. In caso di campioni con basso numero di *E. coli* O157:H7, è opportuno usare metodiche di arricchimento prima dell'inoculo del terreno.

CHROMagar O157 è stato originariamente sviluppato da A. Rambach, CHROMagar, Parigi, Francia. Ai sensi di un contratto di licenza, BD ha ottimizzato tale formulazione avvalendosi della proprietà intellettuale esclusiva usata nella produzione del terreno su piastra pronto per l'uso **BBL CHROMagar O157**.

I nutrienti sono forniti da peptoni **Difco** appositamente selezionati. L'aggiunta di tellurito di potassio, cefixime e cefsulodina riduce il numero di ceppi batterici diversi da *E. coli* O157:H7 che crescono in questo terreno. La miscela cromogena è costituita da substrati artificiali (cromogeni), che liberano un composto colorato insolubile quando vengono idrolizzati da un enzima specifico. *E. coli* O157:H7 utilizza uno dei substrati cromogeni sviluppando colonie color malva. La crescita di colonie color malva è considerata presuntiva per *E. coli* O157:H7 su **BBL CHROMagar O157**. I batteri diversi da *E. coli* O157:H7 possono utilizzare altri substrati cromogeni dando luogo a colonie di colore blu - blu/verde; in alternativa, se non si utilizzano substrati cromogeni, le colonie possono apparire del loro colore naturale. Ciò facilita la rilevazione e differenziazione di *E. coli* O157:H7 da altri microrganismi.

*I CAMPIONI FORNITI DAL PRODUTTORE DI QUESTO MODELLO DI KIT PER TEST SONO STATI VALUTATI IN MODO INDIPENDENTE DALL'AOAC RESEARCH INSTITUTE E SONO RISULTATI CONFORMI ALLE SPECIFICHE PRESTAZIONALI RIPORTATE NEL FOGLIETTO ILLUSTRATIVO ALLEGATO AL KIT. IL PRODUTTORE CERTIFICA CHE QUESTO KIT È CONFORME SOTTO TUTTI GLI ASPETTI ALLE SPECIFICHE ORIGINARIAMENTE VALUTATE DALL'AOAC RESEARCH INSTITUTE, SECONDO QUANTO RIPORTATO NEL *Performance Tested Methods* - CERTIFICATO NUMERO 090501.

REAGENTI

BD CHROMagar O157 Medium

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Cromopeptone	16,0 g
Cloruro di sodio	7,0 g
Mix cromogeno	0,65 g
Tellurito di potassio	2,5 mg
Cefixime	0,05 mg
Cefsulodina	4,0 mg
Agar	14,0 g

pH: 7,1 ± 0,2

*Formulazione aggiustata e/o supplementata per soddisfare i criteri prestazionali.

PRECAUZIONI

IVD . Solo per uso professionale.

Se si riscontra un'umidità eccessiva, capovolgere il fondo su un coperchio e lasciare asciugare all'aria per evitare la formazione di aderenze tra la parte superiore e inferiore della piastra durante l'incubazione. Proteggere la piastra dalla luce mentre si asciuga. Vedere

CONSERVAZIONE E VITA UTILE.

Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni di colore, essiccamento, fessurazioni o altri segni di deterioramento.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle Precauzioni standard.⁸⁻¹¹

I campioni alimentari possono contenere microrganismi patogeni, quali *E. coli* O157. Durante tutte le procedure, attenersi alle tecniche asettiche e alle precauzioni stabilite contro i rischi microbiologici.

Dopo l'uso, le piastre pronte per l'uso, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **Istruzioni generali per l'uso**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare le piastre al buio a 2–8 °C nella confezione originaria fino al momento dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Le piastre possono essere inoculate sino alla data di scadenza (vedere l'etichetta della confezione) e incubate per i tempi di incubazione consigliati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Le piastre prelevate dalle confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana se conservate in luogo pulito a 2–8 °C. **Ridurre al minimo l'esposizione alla luce prima e durante l'incubazione, in quanto la luce distrugge i cromogeni.**

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Controllare le prestazioni inoculando un campione rappresentativo di piastre con colture pure di microrganismi di controllo stabili che producono reazioni note e attese (per dettagli, vedere il documento **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**). Si raccomandano i ceppi per test indicati nella tabella sottostante. Incubare al buio, in aerobiosi per 18–24 h a 35 ± 2 °C.

Ceppi	Risultati della crescita
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728 (=NCTC 12900)	Crescita da discreta a eccellente. Colonie da grigio-violetto a rosa-violetto (= malva)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inibizione da parziale a completa; colonie verdazzurre; possono essere circondate da un alone verdazzurro.
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Crescita: colonie da verdazzurro a blu
Non inoculati	Da incolore a beige chiaro, trasparenti

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una corretta esecuzione delle procedure relative al controllo di qualità, si raccomanda di consultare le linee guida Clinical and Laboratory Standards Institute (già NCCLS) in materia.

PROCEDURA

Materiali forniti

BD CHROMagar O157 Medium (piastre impilate **Stacker** da 90 mm), microbiologicamente controllato.

Materiali necessari ma non forniti – Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e altre apparecchiature di laboratorio necessarie.

Tipi di campioni

Uso clinico: per informazioni dettagliate sulle procedure di raccolta e trattamento dei campioni, consultare le procedure di laboratorio. Questo terreno di coltura viene utilizzato per l'isolamento di *Escherichia coli* O157:H7 da campioni fecali o tamponi rettali di pazienti con sospetta infezione da parte di questo agente.

Test agroalimentari: per informazioni dettagliate sulla preparazione e sul trattamento dei campioni in base al tipo di campione e alla località geografica, seguire le metodiche standard appropriate.

Vedere anche **CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**.

Procedura del test

Adottare tecniche aseptiche. La superficie agar deve essere omogenea e non eccessivamente umida.

Campioni clinici: non appena pervengono in laboratorio, inoculare i campioni su una piastra **BBL CHROMagar O157** e strisciare per l'isolamento. Se il campione viene posto in coltura da un tampone, passare il tampone su una piccola area della superficie del bordo e strisciare da questa area con un'ansa. In alternativa, le piastre possono essere inoculate partendo da prearricchimenti. Incubare le piastre in aerobiosi a 35 ± 2 °C per 18–24 h in posizione invertita (lato agar rivolto verso l'alto). Per consentire la rilevazione di altri patogeni enterici, è possibile inoculare anche altri terreni quali **BD MacConkey II Agar**.

Campioni alimentari: consultare la documentazione appropriata e seguire le metodiche standard applicabili. Inoculare il brodo di arricchimento incubato o le particelle di campione alimentare derivate da screening su **BBL CHROMagar O157** e strisciare per l'isolamento. Incubare le piastre in aerobiosi a 35 ± 2 °C per 18–24 h in posizione invertita (lato agar rivolto verso l'alto).

Risultati

Dopo un'appropriata incubazione, leggere le piastre su uno sfondo bianco. *E. coli* O157:H7 produce sul terreno **CHROMagar O157** colonie che presentano una colorazione malva. Tutte le colone malva devono essere confermate con metodi biochimici e/o sierologici prima di essere refertate come *E. coli* O157:H7.^{1,2,3,6} I microrganismi gram-positivi devono essere completamente inibiti. I microrganismi gram-negativi diversi da *E. coli* O157:H7 vengono inibiti, oppure sviluppano colonie incolori, blu, verdi, verdazzurro (verde acqua) o di colore naturale.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

BD CHROMagar O157 è un terreno di coltura cromogeno per l'isolamento selettivo e l'identificazione presuntiva di *E. coli* O157:H7 da fonti cliniche, alimentari, veterinarie e ambientali.

Risultati prestazionali¹²

Test clinici - In un ospedale metropolitano, sono stati complessivamente valutati 110 isolati fecali congelati e 16 colture fecali (10 fresche e 6 conservate) usando **BBL CHROMagar O157**, Sorbitol MacConkey (SMAC) e Sorbitol MacConkey con Cefixime e Tellurito (SMAC-CT). Gli isolati fecali congelati erano costituiti da 50 *E. coli* O157:H7, 15 *E. coli* non O157, 8 *E. coli* non

O157 positivi per Shiga-toxin e altri 37 ceppi di *Enterobacteriaceae* e bacilli gram-negativi non fermentanti. Sette dei 16 campioni fecali testati sono risultati positivi per *E. coli* O157:H7. Sono state osservate le seguenti sensibilità e specificità:

	Sensibilità (n.)	Specificità (n.)
BBL CHROMagar O157	98 % (56/57)	100 % (69/69)
SMAC	96 % (55/57)	80% (55/69)
SMAC-CT	100 % (57/57)	93% (64/69)

Test agroalimentari

BBL CHROMagar O157 è stato validato dall'AOAC Research Institute nell'ambito del programma Performance Tested Methods.¹² **BBL CHROMagar O157** è stato valutato per la rilevazione di *E. coli* O157:H7 in carne di manzo macinata cruda e succo di mela non pastorizzato usando campioni seminati. Il recupero di *E. coli* O157:H7 su **BBL CHROMagar O157** è stato comparato ai terreni di riferimento su piastra FDA BAM, USDA FSIS e ISO. Per i terreni di riferimento e **BBL CHROMagar O157**, sono state seguite le procedure di riferimento raccomandate per l'arricchimento e lo screening. La separazione immunomagnetica (IMS) è stata eseguita secondo le metodiche USDA e ISO. Dei 180 campioni alimentari testati, 45 sono stati esaminati con le metodiche FDA BAM e USDA FSIS, mentre 90 sono stati testati usando le metodiche ISO. **BBL CHROMagar O157** ha fornito una sensibilità del 100% e una specificità del 100% rispetto alle metodiche di riferimento per entrambe le matrici alimentari. Nei test delle matrici alimentari non sono stati riscontrati falsi negativi. Nessuna differenza statistica è stata rilevata nel recupero usando la metodica **BBL CHROMagar O157** rispetto ai terreni di riferimento su piastra basati sull'analisi del chi-quadro. Gli isolati conosciuti, inclusi 54 ceppi di *E. coli* O157:H7 (3 dei quali ceppi non mobili) e 32 ceppi non *E. coli* O157:H7, sono stati valutati su **BBL CHROMagar O157** con una sensibilità e specificità del 100%. I risultati di questi studi dimostrano che **BBL CHROMagar O157** è un terreno efficace per il recupero e la rilevazione di *E. coli* O157:H7 in carne di manzo macinata cruda e succo di mela non pastorizzato usando le metodiche FDA BAM, USDA FSIS e ISO. La Tabella 1 riepiloga i risultati degli studi di comparazione delle metodiche di validazione.

Tabella 1. Sintesi dei risultati della comparazione delle metodiche di validazione

Matrice alimentare	Metodica	Livello di inoculo	Totale campioni	Totale positivi	Riferimento positivi	CHROMagar O157 positivi	Concordanza metodica ¹	Chi quadro ³
Carne di manzo cruda macinata	Manzo USDA	Alto	20	15	12	15	85% ²	1.33
		Basso	20	13	10	13	85% ²	1.33
		Controllo	5	0	0	0	-	-
Carne di manzo cruda macinata	Manzo ISO	Alto	20	17	16	17	95% ²	0.00
		Basso	20	10	9	10	95% ²	0.00
		Controllo	5	0	0	0	-	-
Succo di mela non pastorizzato	Succo di mela ISO	Alto	20	19	19	19	100%	0.00
		Basso	20	14	14	14	100%	0.00
		Controllo	5	0	0	0	-	-
Succo di mela non pastorizzato	Succo di mela FDA	Alto	20	13	13	13	100%	0.00
		Basso	20	10	10	10	100%	0.00
		Controllo	5	0	0	0	-	-

¹ Rappresenta la percentuale di campioni positivi e negativi confermati, combinati, risultati equivalenti tra le metodiche di riferimento e **BBL CHROMagar O157**.

² Altri campioni positivi rilevati mediante la metodica **BBL CHROMagar O157**: 3 positivi in più rilevati testando la carne di manzo cruda macinata con la metodica USDA/FSIS e 1 positivo in più rilevato testando la carne di manzo cruda macinata con la metodica ISO.

³ I valori chi quadro < 3,84 indicano nessuna differenza significativa a p<0,05.

Limitazioni della procedura

BBL CHROMagar O157 non rileva sierotipi enteroemorragici o enteropatogeni di *E. coli* diversi da O157:H7, poiché questi possono differire biochimicamente. I ceppi di *E. coli* O157:H7 β-glucuronidasi-positivi non vengono rilevati su **BBL CHROMagar O157**; tali ceppi sono tuttavia rari.

BD CHROMagar O157 non differenzia i ceppi di *E. coli* O157:H7 che producono tossine da quelli che non ne producono.

Su questo terreno, possono crescere microrganismi diversi da *E. coli* O157:H7, come per esempio *Proteus* spp., che tuttavia sviluppano generalmente una colorazione diversa. Qualora si

riscontrassero colonie malva non isolate, l'isolamento può essere ottenuto mediante subcoltura su un'altra piastra **BBL CHROMagar O157**. Sono stati riscontrati ceppi rari di *E. coli* (biochimicamente simile a *Shigella*) che producono risultati falsamente positivi su **BBL CHROMagar O157**. L'incubazione a temperature inferiori a quelle raccomandate può ritardare la rilevazione di reazioni positive. Se la temperatura di incubazione è inferiore a 35 ± 2 °C, le piastre devono essere incubate per 24 ore esatte prima di refertare un esito negativo.¹²

Ai fini dell'identificazione definitiva, sono necessari test di conferma.^{1-3,6}

Questo terreno non deve essere usato per l'isolamento di agenti patogeni enterici diversi da *E. coli* O157:H7.

BIBLIOGRAFIA

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.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD CHROMagar O157 Medium

N. di cat. 254105

Terreni su piastra pronti per l'uso, confezioni da 20

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



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.