



BD BBL CHROMagar O157

Patent USA nr 6,165,743



*See footnote below

PRZEZNACZENIE

BBL CHROMagar O157 jest selektywnym podłożem przeznaczonym do izolacji, różnicowania i wstępnej identyfikacji *Escherichia coli* O157:H7 ze źródeł klinicznych, weterynaryjnych, pokarmowych i środowiskowych.

Podłoże **BBL CHROMagar O157** zostało zatwierdzone przez instytut AOAC-Research Institute w ramach programu Performance Tested MethodsSM do analizy próbek surowego mielonego mięsa wołowego i niepasteryzowanego cydru jabłkowego metodami FDA BAM, USDA FSIS oraz ISO.¹⁻³

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

E. coli O157:H7 jest patogenem izolowanym najczęściej z krwawych stolców.⁴⁻⁶ Jednak brak krwawej biegunki nie wyklucza obecności *E. coli* O157:H7.⁷ Ten serotyp wywołuje szereg różnych chorób, od łagodnej, niekrwawej biegunki po ciężkie biegunki krwawe (krwotoczne zapalenie okrężnicy), zespół hemolityczno-mocznicowy i zgon.⁴⁻⁶ W wielu regionach i grupach wiekowych poziom izolacji *E. coli* O157:H7 przekracza poziom izolacji innych patogenów jelitowych, zwłaszcza z rodzaju *Shigella*. Patogeny są przenoszone najczęściej wskutek spożycia surowego lub niedogotowanego mięsa wołowego; możliwe jest także przenoszenie przez inne rodzaje pokarmów.⁴⁻⁶ Ponadto możliwe jest przenoszenie bezpośrednio z człowieka na człowieka, a także przez zbiorniki wody rekreacyjnej.⁴⁻⁶

Podłoże **CHROMagar O157** jest przeznaczone do izolacji, różnicowania i wstępnej identyfikacji szczepów *E. coli* O157:H7. Ze względu na obecność w podłożu substratów chromogennych, kolonie *E. coli* O157:H7 dają zabarwienie różowofioletowe, pozwalając tym samym na wstępną izolację kolonii na płytce do pierwotnego izolowania oraz odróżnienie ich od innych drobnoustrojów. W próbkach z niewielką liczbą drobnoustrojów *E. coli* O157:H7 wskazane może być zastosowanie technik wzbogacania przed posianiem podłoża.

Podłoże **CHROMagar O157** zostało pierwotnie opracowane przez A. Rambacha, CHROMagar, Paryż, Francja. Firma BD, na mocy umowy licencyjnej, zoptymalizowała tę formułę, korzystając z własnych zastrzeżonych rozwiązań używanych do wytwarzania gotowego podłoża na płytkach **BBL CHROMagar O157**.

Składnikami odżywczymi są specjalnie wyselekcjonowane peptony **Difco**. Dodatek telluranu potasu, cefiksymu i cefsulodyny ogranicza liczbę wzrastających na tym podłożu bakterii innych niż *E. coli* O157:H7. Mieszanka chromogenów składa się ze sztucznych substratów (chromogenów), które w wyniku rozkładu przez określone enzymy tworzą nierozpuszczalne, barwne związki. *E. coli* O157:H7 wykorzystują jeden z substratów chromogennych, tworząc różowofioletowe kolonie. Wzrost różowofioletowych kolonii na podłożu **BBL CHROMagar O157**

*PRZEDSTAWIONE PRZEZ PRODUCENTA PRÓBKIE TEGO ZESTAWU TESTOWEGO ZOSTAŁY NIEZALEŻNIE PRZEBADANE PRZEZ INSTYTUT AOAC I W WYNIKU TYCH BADAŃ STWIERDZONO, ŻE DZIAŁAJĄ ONE ZGODNIE ZE SPECYFIKACJĄ PODANĄ PRZEZ PRODUCENTA W ULOTCE OPISOWEJ ZESTAWU TESTOWEGO. PRODUCENT ZAŚWIADCZA, ŻE TEN ZESTAW JEST POD KAŻDYM WZGLĘDEM ZGODNY ZE SPECYFIKACJĄ BADANĄ PRZEZ INSTYTUT AOAC OPISANĄ W ŚWIADECTWIE NUMER 090501 Z BADANIA METODĄ *Performance Tested Methods*SM.

oznacza wstępną identyfikację *E. coli* O157:H7. Bakterie inne niż *E. coli* O157:H7 mogą wykorzystywać inne substraty chromogenne, tworząc kolonie zabarwione na kolor od niebieskiego do niebieskozielonego, natomiast jeśli substraty chromogenne nie zostaną wykorzystane, wytworzone kolonie mają kolor naturalny. Ułatwia to wykrywanie i różnicowanie szczepów *E. coli* O157:H7 od innych drobnoustrojów.

ODCZYNNIKI

BD CHROMagar O157 Medium

Przybliżony skład* w przeliczeniu na 1 litr wody oczyszczonej

Chromopepton	16,0 g
Chlorek sodu	7,0 g
Mieszanka chromogenów	0,65 g
Telluran potasu	2,5 mg
Cefiksym	0,05 mg
Cefsulodyna	4,0 mg
Agar	14,0 g

pH: 7,1 ± 0,2

*Dostosowany i (lub) uzupełniony zgodnie z wymaganiami w celu spełnienia kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych.

W razie zaobserwowania nadmiernego zawilgocenia należy wysuszyć dolną powierzchnię płytki na powietrzu, aby nie dopuścić do powstawania warstwy wody między górną a dolną częścią płytki w trakcie inkubacji. Chronić przed światłem podczas suszenia. Patrz **WARUNKI I OKRES PRZECHOWYWANIA**.

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne zjawiska wskazujące na pogorszenie jakości. W próbkach mogą być obecne drobnoustroje patogenne, takie jak wirusy zapalenia wątroby i wirus HIV. Podczas pracy z materiałami skażonymi krwią i innymi płynami ustrojowym należy przestrzegać „Standardowych środków ostrożności”⁸⁻¹¹ oraz wytycznych obowiązujących w danej placówce.

W próbkach pokarmu mogą być obecne drobnoustroje patogenne, takie jak *E. coli* O157. Podczas wykonywania wszystkich procedur należy przestrzegać zasad aseptyki i obowiązujących środków ostrożności, dotyczących zagrożenia mikrobiologicznego.

Używane płytki z preparatami, pojemniki na próbki oraz inne materiały skażone należy przed wyrzuceniem poddać sterylizacji w autoklawie.

Procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz usuwanie zużytego produktu opisano w dokumencie **OGÓLNA INSTRUKCJA DOTYCZĄCA STOSOWANIA**.

WARUNKI I OKRES PRZECHOWYWANIA

Dostarczone płytki należy przechowywać w ciemnym pomieszczeniu, w temperaturze od 2 do 8 °C, w oryginalnych opakowaniach w formie rękawa, aż do momentu użycia. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Nie otwierać do chwili użycia. Płytki należy wykorzystać do posiewu bakterii przed upływem daty ważności (zobacz etykietę na opakowaniu) i inkubować zgodnie z zalecanymi czasami inkubacji. Przed posiewem ogrzać podłoże do temperatury pokojowej.

Płytki z otwartego opakowania zawierającego 10 płytek mogą zostać użyte w ciągu tygodnia pod warunkiem przechowywania w czystym miejscu, w temperaturze od 2 do 8 °C. **Przed inkubacją oraz podczas niej należy ograniczyć do minimum ekspozycję na światło, gdyż może ono zniszczyć układ chromogenów.**

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Sprawdzić zachowanie hodowli, wykonując na reprezentatywnych próbkach podłoża posiew czystych kultur stabilnych szczepów kontrolnych, dających znane, prawidłowe reakcje (szczegółowe informacje zawiera dokument **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**). Zaleca się korzystanie ze szczepów testowych wymienionych w poniższej

Tabeli. Inkubować w atmosferze tlenowej, przez okres 18–24 h, w temperaturze 35 ± 2 °C, w zacienionym miejscu.

Szczepy bakteryjne	Wzrost
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728 (=NCTC 12900)	Wzrost dość dobry do bardzo dobrego. Kolonie szarofioletowe do różowofioletowych
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Częściowe lub całkowite zahamowanie wzrostu; kolonie niebieskozielone; mogą występować niebieskozielone obwódki
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Wzrost: kolonie niebieskozielone lub niebieskie
Bez posiewu	Bezbarwne do jasnobieżowego, przejrzyste

Należy postępować zgodnie z obowiązującymi wymogami kontroli jakości, wynikającymi z przepisów miejscowych, krajowych i (lub) federalnych, wymogami akredytacji i rutynowymi procedurami kontroli jakości w danym laboratorium. Zaleca się, aby użytkownicy kliniczni stosowali się do odpowiednich zaleceń amerykańskiego Instytutu Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute, dawniej NCCLS) i dotyczących sposobów kontroli jakości.

PROCEDURA

Dostarczane materiały

Podłoże **BD CHROMagar O157 Medium** (płytki **Stacker** o śr. 90 mm). Sprawdzane pod względem obecności drobnoustrojów.

Materiały wymagane, ale niedostarczane: Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki, szczepy do kontroli jakości i pozostałe wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Typy próbek

Szczegółowe informacje na temat pobierania próbek i postępowania z nimi w praktyce klinicznej można znaleźć w stosownej literaturze. To podłoże służy do izolacji *Escherichia coli* O157:H7 z próbek kału lub wymazów z odbytu pacjentów, u których podejrzewa się zakażenie tym patogenem.

W badaniach żywności należy stosować odpowiednie standardowe metody przygotowywania próbek i postępowania z nimi, właściwe dla typu próbki i położenia geograficznego.

Zobacz także **CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY**.

Procedura badania

Stosować techniki aseptyczne. Powierzchnia podłoża agarowego powinna być gładka i wilgotna, lecz bez nadmiernej wilgoci.

W przypadku próbek klinicznych po dostarczeniu próbki do laboratorium należy jak najszybciej wykonać posiew, rozprowadzając próbkę na płytce z podłożem **BBL CHROMagar O157**. Jeżeli próbka jest hodowana bezpośrednio z wymazówki, należy przetoczyć wymazówkę po niewielkiej powierzchni na krawędzi płytki, a następnie rozprowadzić materiał eż z tego obszaru. Posiew na płytkach można też wykonać ze wstępnych namnożeń. Płytki należy inkubować w atmosferze tlenowej, w temperaturze 35 ± 2 °C przez 18–24 h, w położeniu odwróconym (stroną z agarem do góry). Niekiedy celowe jest wykonanie posiewu także na innych podłożach, takich jak **BD MacConkey II Agar**, co umożliwi detekcję ewentualnych innych patogenów jelitowych.

W przypadku próbek żywności należy stosować odpowiednie metody standardowe opisane w piśmiennictwie. Posiać próbkę inkubowaną z pożywką do namnażania lub drobinę badanego pokarmu na podłoże **BBL CHROMagar O157** i rozprowadzić. Płytki należy inkubować w atmosferze tlenowej, w temperaturze 35 ± 2 °C przez 18–24 h, w położeniu odwróconym (stroną z agarem do góry).

Wyniki

Po właściwej inkubacji płytki odczytać, porównując z białym tłem. *E. coli* O157:H7 tworzy na pożywce **CHROMagar O157** kolonie o zabarwieniu różowofioletowym. Przed zgłoszeniem dodatniego wyniku testu na obecność *E. coli* O157:H7 wszystkie kolonie o zabarwieniu

różowioletowym należy dodatkowo zweryfikować biochemicznie i/lub serologicznie.^{1,2,3,6} Wzrost drobnoustrojów Gram-dodatnich powinien być całkowicie zahamowany. Wzrost drobnoustrojów Gram-ujemnych innych niż *E. coli* O157:H7 będzie zahamowany lub będzie skutkował rozwojem kolonii bezbarwnych, niebieskich, zielonych, niebieskozielonych (wodnistych) lub w kolorze naturalnym.

CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW I OGRANICZENIA DOTYCZĄCE PROCEDURY
BD CHROMagar O157 jest chromogennym podłożem przeznaczonym do selektywnej izolacji i wstępnej identyfikacji szczepów *E. coli* O157:H7 ze źródeł klinicznych, weterynaryjnych, pokarmowych i środowiskowych.

Wyniki badań skuteczności¹²

Badanie próbek klinicznych: W szpitalu miejskim przebadano łącznie 110 zamrożonych izolatów z kału i 16 posiewów ze stolca (10 świeżych i 6 przechowywanych) przy użyciu podłoży BBL CHROMagar O157, Sorbitol MacConkey (SMAC) oraz Sorbitol MacConkey with Cefixime and Tellurite (SMAC-CT). 50 spośród zamrożonych izolatów z kału zawierało *E. coli* O157:H7, 15 zawierało *E. coli* ze szczepów innych niż O157, 8 zawierało *E. coli* ze szczepów innych niż O157 wytwarzających toksyny Shiga, zaś pozostałe 37 zawierało inne *Enterobacteriaceae* i niefermentacyjne pałeczki Gram-ujemne. W siedmiu na 16 badanych próbek stolca wykryto obecność *E. coli* O157:H7. Uzyskano następujące czułości i poziomy swoistości:

	Czułość (liczba)	Swoistość (liczba)
BBL CHROMagar O157	98 % (56/57)	100 % (69/69)
SMAC	96 % (55/57)	80 % (55/69)
SMAC-CT	100 % (57/57)	93 % (64/69)

Badanie żywności

Podłoże **BBL CHROMagar O157** zostało zatwierdzone przez AOAC-Research Institute w ramach programu Performance Tested Methods.¹² Podłoże **BBL CHROMagar O157** oceniano pod kątem skuteczności wykrywania *E. coli* O157:H7 w surowym mielonym mięsie wołowym i niepasteryzowanym cydrze jabłkowym przy użyciu próbek zaszczepionych. Odzysk *E. coli* O157:H7 na podłożu **BBL CHROMagar O157** porównywano z wynikami uzyskiwanymi na pożywkach na płytkach będących podłożami referencyjnymi dla metod FDA BAM, USDA FSIS i ISO. Zarówno w przypadku podłoży referencyjnych, jak i **BBL CHROMagar O157**, stosowano zalecane procedury namnażania i badań przesiewowych. Separację immunomagnetyczną (IMS) przeprowadzono według metod USDA i ISO. Spośród 180 przebadanych próbek pożywienia, 45 badano metodami FDA BAM i USDA FSIS, a 90 badano metodami ISO. Podłoże **BBL CHROMagar O157** w porównaniu z metodami referencyjnymi charakteryzowało się czułością na poziomie 100 % i swoistością na poziomie 100 % dla obu macierzy próbek pokarmowych. W badaniu macierzy próbek pokarmowych nie stwierdzono fałszywych wyników ujemnych. W wyniku testu Chi-kwadrat nie stwierdzono różnic statystycznych między odzyskiem metodą **BBL CHROMagar O157** a odzyskiem na referencyjnych pożywkach na płytkach. Na podłożu **BBL CHROMagar O157** badano znane izolaty, w tym 54 szczepy *E. coli* O157:H7 (w tym 3 nieruchome) i 32 szczepy inne niż *E. coli* O157:H7, uzyskując czułość i swoistość na poziomie 100%. Wyniki tych badań dowodzą, że **BBL CHROMagar O157** jest skutecznym podłożem do odzysku i wykrywania *E. coli* O157:H7 w próbkach surowego mielonego mięsa wołowego i niepasteryzowanego cydru jabłkowego metodami FDA BAM, USDA FSIS i ISO. Tabela 1 zawiera podsumowanie wyników weryfikacji z podziałem na poszczególne metody.

Tabela 1: Podsumowanie wyników weryfikacji z podziałem na poszczególne metody

Macierz próbek pokarmowych	Metoda	Stężenie inokulum	Łączna liczba próbek	Łączna liczba dodatnich	Dodatnie w metodzie referencyjnej	Dodatnie na CHROMagar O157	Zgodność metod ¹	Chi-kwadrat ³
Surowe mielone mięso wołowe	USDA: wołowina	Wysokie	20	15	12	15	85 % ²	1,33
		Niskie	20	13	10	13	85 % ²	1,33
		Kontrola	5	0	0	0	-	-
Surowe mielone mięso wołowe	ISO: wołowina	Wysokie	20	17	16	17	95 % ²	0,00
		Niskie	20	10	9	10	95 % ²	0,00
		Kontrola	5	0	0	0	-	-
Niepasteryzowany cydr jabłkowy	ISO: cydr	Wysokie	20	19	19	19	100 %	0,00
		Niskie	20	14	14	14	100 %	0,00
		Kontrola	5	0	0	0	-	-
Niepasteryzowany cydr jabłkowy	FDA: cydr	Wysokie	20	13	13	13	100 %	0,00
		Niskie	20	10	10	10	100 %	0,00
		Kontrola	5	0	0	0	-	-

¹ Oznacza odsetek potwierdzonych wyników dodatnich i ujemnych (łącznie), które były takie same w metodach referencyjnych i w metodzie **BBL CHROMagar O157**.

² Dodatkowe wyniki dodatnie uzyskane metodą **BBL CHROMagar O157**: 3 dodatkowe dodatnie próbki surowego mielonego mięsa wołowego w porównaniu z metodą USDA/FSIS i 1 dodatkowa dodatnia próbka w porównaniu z metodą ISO.

³ Wartości Chi-kwadrat < 3,84 oznaczają brak znamiennej statystycznie różnicy przy p<0,05.

Ograniczenia procedury

Podłoże **BBL CHROMagar O157** nie umożliwia wykrywania innych niż O157:H7 serotypów *E. coli* wywołujących krwotoki i enteropatię, ponieważ mogą one różnić się pod względem biochemicznym. Szczepy *E. coli* O157:H7 dodatnie pod względem aktywności β-glukoronidazy nie będą wykrywane na podłożu **BBL CHROMagar O157**; szczepy takie występują jednak rzadko.

Podłoże **BD CHROMagar O157** nie daje możliwości odróżnienia szczepów *E. coli* O157:H7 wytwarzających toksyny od szczepów, które ich nie wytwarzają.

Na opisywanym podłożu mogą wzrastać drobnoustroje inne niż *E. coli* O157:H7, takie jak *Proteus* spp.; z reguły jednak kolonie takich drobnoustrojów mają inne zabarwienia. W razie zaobserwowania nieizolowanych kolonii fioletoworóżowych możliwe jest uzyskanie izolacji poprzez wykonanie kolejnego posiewu na inną płytkę **BBL CHROMagar O157**. Donoszono o rzadko występujących szczepach *E. coli* (pod względem biochemicznym podobnych do rodzaju *Shigella*) dających na podłożu **BBL CHROMagar O157** wyniki fałszywie dodatnie. Inkubacja w temperaturach niższych od zalecanych może opóźnić wykrycie reakcji dodatnich. Jeśli temperatura inkubacji jest niższa od 35 ± 2 °C, płytki należy inkubować przez pełne 24 h; dopiero po tym czasie możliwe jest stwierdzenie wyniku ujemnego.¹²

Ostateczna identyfikacja wymaga potwierdzenia dodatkowymi badaniami.^{1-3,6}

Nie należy używać tego podłoża do izolacji patogenów jelitowych innych niż *E. coli* O157:H7.

PIŚMIENNICTWO

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 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.

- Yolken (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, HHS 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.

PAKOWANIE / DOSTĘPNOŚĆ

BD CHROMagar O157 Medium

Nr kat. 254105

Gotowe podłoża na płytkach hodowlanych, po 20 sztuk

DODATKOWE INFORMACJE

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy BD.



Becton Dickinson GmbH

BD Diagnostic Systems

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Niemcy

Tel.: +49-62 21-30 50

Faks: +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.