



BD BBL CHROMagar O157

Americký patent číslo 6 165 743



*See footnote below

POUŽITIE

BBL CHROMagar O157 (Chromogénna pôda BBL O157) je selektívna pôda na izoláciu, diferenciáciu a predpokladanú identifikáciu *Escherichia coli* O157:H7 z klinických, potravinových a veterinárnych vzoriek a vzoriek z prostredia.

Pôda **BBL CHROMagar O157** bola validovaná ústavom AOACTM Research Institute v rámci programu Performance Tested MethodsSM Program na analýzu mletého surového hovädzieho mäsa a nepasterizovaného jablčného muštu pri používaní metód noriem FDA BAM, USDA FSIS a ISO.¹⁻³

PRINCÍPY A VYSVETLENIE POSTUPU

Mikrobiologická metóda.

E. coli O157:H7 je najčastejšie izolovaný patogén z krvavej stolice.⁴⁻⁶ Absencia krvavej hnačky však nevylučuje prítomnosť *E. coli* O157:H7.⁷ Tento sérotyp spôsobuje širokú škálu chorôb od miernej nekrvavej hnačky po vážnu krvavú hnačku (hemolytická kolitída), hemolytický uremický syndróm a smrť.⁴⁻⁶ Izolácia organizmu *E. coli* O157:H7 v mnohých oblastiach a vekových skupinách prekračuje izoláciu niektorých iných bežných črevných patogénov, najmä *Shigella*. K prenosu najčastejšie dochádza požitím surového alebo nedostatočne uvareného hovädzieho mäsa, boli však implikované aj iné potraviny.⁴⁻⁶ Ďalej môže dôjsť k prenosu z osoby na osobu, ako aj zo zdrojov nepitnej vody.⁴

Pôda **CHROMagar O157** je určená na izoláciu, diferenciáciu a predpokladanú identifikáciu baktérie *E. coli* O157:H7. Vďaka chromogénnym substrátom v pôde produkujú kolónie *E. coli* O157:H7 svetlofialovú farbu, ktorá umožňuje predpokladanú identifikáciu z primárnej izolačnej pôdy a diferenciáciu od ostatných organizmov. Vo vzorkách s nízkym počtom *E. coli* O157:H7 môže pomôcť obohatenie pred naočkovaním pôdy.

Pôdu **CHROMagar O157** pôvodne vyvinul A. Rambach z firmy CHROMagar Paríž, Francúzsko. Na základe licencie spoločnosť BD optimalizovala zloženie pôdy využívajúc vlastné poznatky z výroby pripravenej pôdy v Petriho miskách **BBL CHROMagar O157**.

Výživné látky v pôde poskytujú špeciálne vybrané peptóny **Difco**. Prídavok teluranu draselného, cefiximu a cefsulodinu znižuje počet baktérií iných ako *E. coli* O157:H7, ktoré rastú na tejto pôde. Chromogénová zmes sa skladá z umelých substrátov (chromogénov), ktoré pri hydrolyzovaní špecifickými enzýmami uvoľňujú nerozpustné sfarbené zlúčeniny. Baktéria *E. coli* O157:H7 využíva jeden z chromogénnych substrátov a vytvára svetlofialové kolónie. Rast svetlofialových kolónií sa považuje za predpoklad prítomnosti *E. coli* O157:H7 na pôde **BBL CHROMagar O157**. Baktérie iné ako *E. coli* O157:H7 môžu využiť iné chromogénne substráty a vytvoriť modré až modrozelené kolónie alebo, ak sa chromogénne substráty nevyužijú, prirodzene sfarbené kolónie. Umožňuje to detekciu a diferenciáciu *E. coli* O157:H7 od iných organizmov.

*VÝROBCA – DODANÉ VZORKY TEJTO MODELOVEJ TESTOVACEJ SÚPRAVY BOLI NEZÁVISLE TESTOVANÉ ÚSTAVOM AOAC RESEARCH INSTITUTE. TESTY UKÁZALI, ŽE PARAMETRE VÝROBKU, DEKLAROVANÉ VÝROBCOM NA POPISNOM PRÍBALOVOM LETÁKU TESTU, ZODPOVEDAJÚ SKUTOČNOSTI. VÝROBCA ZARUČUJE, ŽE TÁTO TESTOVACIA SÚPRAVA SPLŇA VŠETKY PARAMETRE PÔVODNE HODNOTENÉ VÝSKUMNÝM ÚSTAVOM AOAC, AKO JE PODROBNE POPÍSANÉ V ATESTE *Performance Tested Methods*SM, ČÍSLO CERTIFIKÁTU 090501.

ZLOŽENIE

BD CHROMagar O157 Medium

Približné zloženie* na liter deionizovanej vody:

Chromopeptón	16,0 g
Chlorid sodný	7,0 g
Chromogénová zmes	0,65 g
Teluran draselný	2,5 mg
Cefixím	0,05 mg
Cefsulodin	4,0 mg
Agar	14,0 g

pH: 7,1 ± 0,2

*Upravené alebo doplnené podľa potreby, aby boli splnené analytické parametre.

UPOZORNENIA

IVD . Iba na profesionálne použitie.

Ak v súprave spozorujete nadmernú vlhkosť, obráťte súpravu dnom nahor a cez odsunutý vrchnák ju nechajte vyschnúť na vzduchu, aby ste zabránili vytvoreniu izolačnej vrstvy medzi hornou a dolnou časťou misky počas inkubácie. Počas sušenia chráňte pred svetlom. Pozri časť **USKLADNENIE A ŽIVOTNOSŤ**.

Pôdu nepoužívajte, ak nesie známky mikrobiálnej kontaminácie, zmeny farby, vysušenia, prasknutia alebo iné znaky poškodenia.

V klinických vzorkách sa môžu vyskytovať patogénne mikroorganizmy vrátane vírusov hepatitídy a vírusu HIV. Pri práci so všetkými materiálmi kontaminovanými krvou a inými telesnými tekutinami dodržujte Štandardné pracovné postupy⁸⁻¹¹ a smernice príslušných inštitúcií.

Vo vzorkách potravín sa môžu nachádzať patogénne mikroorganizmy vrátane *E. coli* O157.

Dodržiavajte aseptické techniky a schválené preventívne opatrenia proti mikrobiologickému riziku. Všetky misky, nádoby so vzorkami a iný kontaminovaný materiál sa po použití musia sterilizovať v autokláve a až potom sa môžu vyhodiť.

Ďalšie informácie o postupoch pri práci s aseptikami, o biologicky nebezpečnom odpade a likvidácii použitého produktu nájdete v dokumente **VŠEOBECNÉ POKYNY NA POUŽÍVANIE**.

USKLADNENIE A ŽIVOTNOSŤ

Prijaté misky s pôdou uskladňujte na tmavom mieste pri teplote 2 až 8 °C v pôvodnom obale až do začiatku používania. Nezmrazujte a nevystavujte nadmerným teplotám. Otvorte tesne pred použitím. Pôdy sa môžu použiť na kultiváciu až do dňa expirácie (uvedeného na obale) a môžu byť inkubované podľa odporúčania. Pred inkubáciou pôdu nechajte zohriať na laboratórnu teplotu. Misky z otvorených balení po 10 kusov sa môžu používať jeden týždeň (ak sú uskladnené na čistom tmavom mieste pri teplote 2 až 8 °C). **Minimalizujte ich vystavenie svetlu pred inkubáciou aj počas nej, pretože svetlo môže zničiť chromogény.**

KONTROLA KVALITY UŽÍVATEĽOM

Skontrolujte účinnosť pôdy naočkovaním reprezentatívnej vzorky misiek čistými kultúrami stabilných kontrolných organizmov, ktoré dávajú známe (očakávané) výsledky (ďalšie informácie nájdete v dokumente **VŠEOBECNÉ POKYNY NA POUŽÍVANIE**). Odporúčajú sa testovacie kmene uvedené v tabuľke nižšie. Inkubujte aeróbne 18 až 24 hodín pri teplote 35 ± 2 °C na tmavom mieste.

Kmene	Výsledky rastu
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 700728 (=NCTC 12900)	Rast mierny až výborný. Sivofialové až ružovofialové (svetlofialové) kolónie
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Čiastočná až úplná inhibícia; modrozelené kolónie, môžu byť obklopené modrozeleným kruhom
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Rast: modrozelené až modré kolónie
Nenaočkované	Bezfarebné až svetlobéžové, transparentné

Požiadavky kontroly kvality treba plniť v súlade s požiadavkami správnej laboratórnej praxe, štátnymi a/alebo federálnymi predpismi ako aj požiadavkami akreditácie a podľa postupov správnej laboratórnej praxe platnými v laboratóriu. Odporúčame, aby sa vo vykonávaní kontroly kvality klinický používateľ riadil návodmi Ústavu pre klinické a laboratórne normy (predtým NCCLS).

POSTUP

Dodávaný materiál

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

Potrebný materiál, nedodávaný: Pomocné kultivačné pôdy, činidlá, organizmy na kontrolu kvality a ďalšie laboratórne vybavenie podľa potreby.

Typy vzoriek

V rámci klinického použitia získate podrobnosti o odbere vzoriek a manipulácii s nimi v laboratórnych postupoch. Táto pôda sa používa na izoláciu *Escherichia coli* O157:H7 zo vzoriek stolice alebo rektálnych výterov od pacientov, u ktorých je podozrenie na infekciu týmto organizmom.

Pri testovaní potravín dodržujte príslušné štandardné metódy v rámci detailov o príprave vzoriek a ich spracovaní podľa typu vzoriek a geografickej polohy.

Pozri aj časť **VLASTNOSTI A OBMEDZENIA POSTUPU**.

Postup testu

Používajte aseptickú techniku. Povrch agaru má byť vlhký a rovný, ale bez prílišnej vlhkosti. Pri klinických vzorkách čo najskôr po prijatí do laboratória očkujte vzorku na misku s pôdou **BBL CHROMagar O157** a rozotrite. Ak sa materiál očkuje z vatového tampónu, obtrite tampón o malú časť povrchu pôdy na okraji misky a potom rozočkujte pomocou očka. Alternatívne možno misky naočkovať z vopred obohatených pôd. Misky inkubujte aeróbne pri teplote 35 ± 2 °C počas 18 – 24 hodín v obrátenej polohe (agarovou stranou hore). Na detekciu ďalších črevných patogénov možno naočkovať aj iné pôdy, napríklad **BD MacConkey II Agar**.

V prípade vzoriek potravín si preštudujte príslušnú literatúru a dodržujte príslušné štandardné metódy. Inkubovaný obohatený bujón alebo časticu skúmanej vzorky potraviny naočkujte na pôdu **BBL CHROMagar O157** a rozotrite ju. Misky inkubujte aeróbne pri teplote 35 ± 2 °C počas 18 – 24 hodín v obrátenej polohe (agarovou stranou hore).

Výsledky

Po správnej inkubácii vyhodnoťte misky oproti bielemu pozadiu. *E. coli* O157:H7 vyprodukuje na pôde **BBL CHROMagar O157** svetlofialové kolónie. Všetky svetlofialové kolónie je nutné biochemicky alebo sérologicky potvrdiť skôr, ako sa zaznamenajú ako *E. coli* O157:H7.^{1,2,3,6} Grampozitívne organizmy majú byť úplne inhibované. Gramnegatívne organizmy iné ako *E. coli* O157:H7 budú inhibované alebo vyprodukujú bezfarebné, modré, zelené, modrozelené (farba vody) alebo prirodzené sfarbené kolónie.

VLASTNOSTI A OBMEDZENIA POSTUPU

BBL CHROMagar O157 je chromogénna pôda na selektívnu izoláciu a predpokladanú identifikáciu organizmu *E. coli* O157:H7 z klinických, potravinových a veterinárnych vzoriek a vzoriek z prostredia.

Výsledky účinku¹²

Klinické testovanie: V metropolitnej nemocnici bolo pomocou pôd BBL CHROMagar O157, Sorbitol MacConkey (SMAC) a Sorbitol MacConkey with Cefixime and Tellurite (SMAC-CT) hodnotených celkom 110 zmrazených fekálnych izolátov a 16 stolicových kultúr (10 čerstvých a 6 uskladnených). Medzi zmrazenými fekálnymi izolátmi bolo 50 izolátov *E. coli* O157:H7, 15 izolátov *E. coli* iných ako O157, 8 izolátov *E. coli* iných ako O157 pozitívnych na Shiga toxín a 37 iných organizmov *Enterobacteriaceae* a nefermentačných gramnegatívnych tyčieniek. Zistilo sa, že 7 zo 16 testovaných stolicových vzoriek bolo pozitívnych na *E. coli* O157:H7. Zistili sa nasledovné hodnoty citlivosti a špecificity:

	Citlivosť (počet)	Špecificita (počet)
BBL CHROMagar O157	98 % (56/57)	100 % (69/69)
SMAC	96 % (55/57)	80% (55/69)
SMAC-CT	100 % (57/57)	93% (64/69)

Testovanie potravín

Pôda **BBL CHROMagar O157** bola validovaná ústavom AOAC-Research Institute v rámci programu Performance Tested Methods Program.¹² Pôda **BBL CHROMagar O157** bola hodnotená na detekciu organizmu *E. coli* O157:H7 v mletom surovom hovädzom mäse a nepasterizovanom jablčnom mušte pomocou vzoriek. Izolovanie organizmu *E. coli* O157:H7 na pôde **BBL CHROMagar O157** sa porovnávalo s referenčnými pôdami podľa noriem FDA BAM, USDA FSIS a ISO. Pri referenčnej pôde aj pôde **BBL CHROMagar O157** sa dodržiavali referenčné odporúčané postupy obohatenia a skriningové postupy. Imunomagnetická separácia (IMS) sa vykonala podľa metód noriem USDA a ISO. Zo 180 testovaných vzoriek potravín bolo 45 testovaných metódami noriem FDA BAM a USDA FSIS a 90 bolo testovaných metódami noriem ISO. Pôda **BBL CHROMagar O157** vyprodukovala citlivosť 100 % a špecificitu 100 % pri porovnaní s referenčnými metódami pre obidve potravinové matice. V testovaných potravinových maticiach sa nezistili žiadne mylne negatívne výsledky. Na základe chi-kvadrátovej analýzy sa pri izolácii pomocou pôdy **BBL CHROMagar O157** nezistil žiadny štatistický rozdiel v porovnaní s referenčnou pôdou. Na pôde **BBL CHROMagar O157** s citlivosťou a špecificitou 100 % boli hodnotené známe izoláty vrátane 54 kmeňov *E. coli* O157:H7 (z ktorých 3 boli nepohyblivé) a 32 kmeňov iných ako *E. coli* O157:H7. Výsledky týchto štúdií ukazujú, že **BBL CHROMagar O157** je účinná pôda na izolovanie a detekciu *E. coli* O157:H7 v mletom surovom hovädzom mäse a nepasterizovanom jablčnom mušte pomocou metód noriem FDA BAM, USDA FSIS a ISO. V Tabuľke 1 je uvedený súhrn výsledkov štúdie porovnania validačných metód.

Tabuľka 1: Súhrn výsledkov porovnania validačných metód

Potravinová matrica	Metóda	Úroveň inokula	Vzorky celkom	Pozitívne celkom	Pozitívne na referenčne j pôde	Pozitívne na CHROMagar O157	Zhoda výsledkov ¹	Chi-kvadrát ³
Mleté surové hovädzie mäso	Hovädzie mäso USDA	Kontrola nízkej a vysokej pozitívnosti	20	15	12	15	85% ²	1.33
			20	13	10	13	85% ²	1.33
			5	0	0	0	-	-
Mleté surové hovädzie mäso	Hovädzie mäso ISO	Kontrola nízkej a vysokej pozitívnosti	20	17	16	17	95% ²	0.00
			20	10	9	10	95% ²	0.00
			5	0	0	0	-	-
Nepasterizovaný jablčný mušt	Mušt ISO	Kontrola nízkej a vysokej pozitívnosti	20	19	19	19	100%	0.00
			20	14	14	14	100%	0.00
			5	0	0	0	-	-
Nepasterizovaný jablčný mušt	Mušt FDA	Kontrola nízkej a vysokej pozitívnosti	20	13	13	13	100%	0.00
			20	10	10	10	100%	0.00
			5	0	0	0	-	-

¹ Reprezentuje percento kombinovaných potvrdených pozitívnych a negatívnych vzoriek, ktoré boli rovnaké pri referenčnej pôde a pôde **BBL CHROMagar O157**.

² Ďalšie pozitívne vzorky detekované na pôde **BBL CHROMagar O157**: 3 ďalšie pozitívne vzorky pri testovaní mletého surového hovädzieho mäsa metódou USDA/FSIS a 1 ďalšia pozitívna vzorka pri testovaní mletého surového hovädzieho mäsa metódou normy ISO.

³ Hodnoty chi-kvadrátu < 3,84 znamenajú, že pri p < 0,05 neexistuje žiadny významný rozdiel.

Obmedzenia postupu

Na pôde **BBL CHROMagar O157** sa nedetekujú enterohemoragické alebo enteropatogénne sérotypy *E. coli* iné ako O157:H7, pretože sa môžu biochemicky líšiť. β -glukoronidáza-pozitívne kmene *E. coli* O157:H7 nebudú na pôde **BBL CHROMagar O157** detekované, takéto kmene sa však vyskytujú zriedkavo.

Pôda **BBL CHROMagar O157** nediferencuje medzi kmeňmi *E. coli* O157:H7 produkujúcimi a neprodukujúcimi toxín.

Organizmy iné ako *E. coli* O157:H7, napríklad rod *Proteus*, na tejto pôde môžu rásť, obvykle však vytvoria kolónie inej farby. Ak sa zistia neizolované svetlofialové kolónie, možno ich izolovať subkultiváciou na ďalšej miske pôdy **BBL CHROMagar O157**. Na pôde **BBL CHROMagar O157** sa našli zriedkavé kmene *E. coli* (biochemicky podobné organizmu *Shigella*), ktoré spôsobili mylne pozitívne výsledky. Inkubácia pri nižšej teplote, ako sa odporúča, môže spôsobiť oneskorenie detekcie pozitívnych reakcií. Ak je teplota inkubácie nižšia ako 35 ± 2 °C, misky sa musia inkubovať celých 24 hodín a až potom ich možno zaznamenať ako negatívne.¹² Na rozhodujúcu identifikáciu je nutné vykonať podporné testy.^{1-3,6}

Táto pôda sa nesmie používať na izoláciu črevných patogénov iných ako *E. coli* O157:H7.

POUŽITÁ LITERATÚRA

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, 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. Dáta v súbore, Diagnostické systémy BD.

BALENIE/DOSTUPNOSŤ

BD CHROMagar O157 Medium

Kat. č. 254105

Pôda v Petriho miskách pripravená na použitie, 20 ks

ĎALŠIE INFORMÁCIE

Ak máte záujem o ďalšie informácie, kontaktujte miestneho zástupcu firmy 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.