



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

PRZEZNACZENIE

Podłoże na płytce podwójnej **BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)** służy do izolowania bakterii z rodzajów *Salmonella* i *Shigella* z próbek kału ludzkiego.

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

DCLS Agar, Modified to modyfikowane podłoże Desoxycholate Citrate Agar (agar dezoksycholanowo-cytrynianowy) opisane przez Leifsona.¹ Wzrost bakterii z grupy coli zdolnych do fermentowania laktozy lub sacharozy jest zasadniczo hamowany. Wzrost bakterii Gram-dodatnich jest zahamowany. Badając patogeny jelitowe na podłożu Endo, Holt-Harris i Teague wykorzystali laktozę i sacharozę do opracowania agaru odżywczego zawierającego błękit metylenowy i eozynę. Niektóre bakterie z grupy coli z większą łatwością fermentują sacharozę niż laktozę.² Dzięki dodatkowi sacharozy z niepatogennych organizmów fermentujących sacharozę powstają różowoczerwone, łatwo rozpoznawalne kolonie, co ogranicza liczbę odczynów fałszywie dodatnich.

Jest wiele modyfikacji pierwotnego składu agaru DCLS.^{3,4} W składzie tego podłoża znajduje się więcej laktozy i sacharozy, a mniej cytrynianu, przez co sprzyja wzrostowi bakterii *Shigella* nieco lepiej niż zwykły agar DCLS. Ponadto umożliwia to wykrywanie *Yersinia enterocolitica*. W agarze DCLS źródłem azotu są ekstrakt mięsny i pepton, natomiast ekstrakt z drożdży zawiera witaminy. Laktoza i sacharoza są ulegającymi fermentacji węglowodanami, które wykorzystywane są przez wiele niepatogennych gatunków pałeczek Gram-ujemnych, takich jak *Escherichia coli*, jednak nie przez gatunki *Salmonella* i *Shigella*. Cytrynian sodu, tiosiarczan sodu i dezoksycholan sodu są środkami selektywnymi. Czerwień obojętna jest wskaźnikiem pH.

Podłoże Hektoen Enteric Agar (HEA) zostało opracowane w 1967 r. przez Kinga i Metzgera z Instytutu Hektoen jako materiał do izolowania bakterii *Shigella* i *Salmonella* lepszy niż inne, często wówczas używane pożywki.⁵ Podłoże uważa się za umiarkowanie selektywne, szczególnie przydatne do izolowania gatunków z rodzaju *Shigella*. Obecny skład podłoża różni się od oryginalnego brakiem dezoksycholanu sodu oraz zmniejszonym stężeniem soli kwasów żółciowych. Ponadto zwiększono stężenie peptonu, aby zrównoważyć działanie hamujące soli kwasów żółciowych.³

Dzięki solom kwasów żółciowych podłoże to jest selektywne – hamuje wzrost drobnoustrojów Gram-dodatnich i redukuje wzrost niektórych bakterii Gram-ujemnych innych niż *Salmonella* i *Shigella*. W celu optymalizacji różnicowania na podstawie zabarwienia kolonii i ich otoczenia do podłoża dodaje się także laktozę, sacharozę i salicynę. Szczepy *Salmonella* i *Shigella* nie są zdolne do fermentacji tych związków węgla, w związku z czym nie powodują zmiany koloru układu wskaźników pH, natomiast organizmy fermentujące jeden lub kilka spośród wymienionych składników do kwasów, np. *E. coli*, powodują zmianę zabarwienia na żółte, pomarańczowe lub łososiowe. Zawarty w podłożu cytrynian amonu i żelaza (III) i tiosiarczan sodu umożliwiają wykrycie wytwarzania siarkowodoru przez *Salmonella*. Układ wskaźników pH składa się z fuksyny kwaśnej i błękitu bromotymolowego. Taki skład zalecany jest jako jedno z wielu podłoży na płytkach do hodowli *Enterobacteriaceae* z próbek kału.⁶⁻⁸

Podłoże na płytce podwójnej **BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)** stanowi połączenie dwóch selektywnych podłoży różnicujących i służy do izolowania bakterii z rodzajów *Salmonella* i *Shigella* z kału ludzkiego.

ODCZYNNIKI

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

Skład* w przeliczeniu na litr wody oczyszczonej

DCLS Agar, Modified		Hektoen Enteric Agar	
Pepton mięsny (trzuskowy)	5,0 g	Pepsynowy wyciąg tkanki zwierzęcej	12,0 g
Ekstrakt drożdżowy	2,5	Ekstrakt drożdżowy	3,0
Ekstrakt mięsny	2,5	Sole kwasów żółciowych	9,0
Laktoza	10,0	Laktoza	12,0
Sacharoza	10,0	Sacharoza	12,0
Cytrynian amonu i żelaza (III)	1,0	Salicyna	2,0
Dezoksycholan sodu	2,5	Chlorek sodu	5,0
Tiosiarczan sodu	5,0	Tiosiarczan sodu	5,0
Cytrynian sodu	1,0	Cytrynian amonu i żelaza (III)	1,5
Czerwień obojętna	0,02	Błękit bromotymolowy	0,064
Agar	10,0	Fuksyna kwaśna	0,1
pH 7,5+/-0,2		Agar	13,5
		pH 7,6+/-0,2	

*Odpowiednio skorygowany lub uzupełniony w celu spełnienia kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych. 

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości.

W dokumencie **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA** podano procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz sposób utylizacji zużytego produktu.

PRZECHOWYWANIE I DOPUSZCZALNY OKRES MAGAZYNOWANIA

Dostarczone płytki należy przechowywać w zaciemnionym pomieszczeniu, w temperaturze od 2 do 8 °C, w oryginalnych opakowaniach w formie rękawa, aż do momentu użycia. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Płytki należy wykorzystać do posiewu bakterii przed upływem daty ważności (zobacz etykietę na opakowaniu) i inkubować zgodnie z zalecanymi czasami inkubacji. Płytki z otwartego zestawu 10 płytek można zużyć w ciągu jednego tygodnia, pod warunkiem przechowywania w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8 °C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Reprezentatywne próbki podłoża zaszczipia się hodowlami wymienionych niżej szczepów (szczegółowe informacje — patrz dokument **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**). Inkubować płytki w temperaturze 35 ± 2 °C w warunkach tlenowych. W niektórych przypadkach bakterie z rodzaju *Shigella* mogą wymagać inkubacji przez 42–48 godzin.

Płytki należy badać po 18–24 i po 42–48 godzinach, oceniając stopień wzrostu, wielkość kolonii, zabarwienie i selektywność.

Szczepy	DCLS Agar, Modified	Hektoen Enteric Agar
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Brak wzrostu do wzrostu dość dobrego; kolonie różowoczerwone, wokół kolonii mogą występować osady	Częściowe lub całkowite zahamowanie wzrostu; kolonie żółtopomarańczowe, wokół kolonii może występować osad, obwódki łososiowe do pomarańczowych
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Całkowite zahamowanie wzrostu	Częściowe lub całkowite zahamowanie wzrostu; kolonie małe, żółte, obwódki łososiowe do pomarańczowych
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Pomarańczowoczerwone kolonie, wzrost dość dobry do dobrego	Niebieskozielone do niebieskich z czarnymi środkami
<i>Salmonella</i> Abony DSM 4224	Kolonie pomarańczowoczerwone do żółtych, wzrost dobry lub bardzo dobry	Wzrost dobry lub bardzo dobry; kolonie zielone do niebieskozielonych z czarnym środkiem
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	Kolonie pomarańczowoczerwone do żółtych, wzrost dobry lub bardzo dobry	Wzrost dobry lub bardzo dobry; kolonie zielone do niebieskozielonych z czarnym środkiem
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Kolonie pomarańczowoczerwone do żółtych, wzrost dość dobry do bardzo dobrego	Wzrost dość dobry do bardzo dobrego; kolonie jasnozielone
Bez posiewu	Pomarańczowoczerwone, nieznacznie opalizujące	Zielone, niemal przezroczyste

PROCEDURA

Dostarczane materiały

BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (płytki podwójne **Stacker** 90 mm).
Sprawdzane pod względem obecności drobnoustrojów.

Materiały niedostarczane

Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki oraz wyposażenie laboratoryjne zgodne z wymaganiami.

Typy próbek

Opisywane podłoże jest przeznaczone do hodowli z próbek kału pochodzących od pacjentów z podejrzeniem bakteryjnego zakażenia jelit oraz z podobnych materiałów, np. wymazów z odbytu (patrz także **CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA I OGRANICZENIA PROCEDURY**).^{7,8}

Procedura testowa

Posiew próbki należy wykonać niezwłocznie po jej dostarczeniu do pracowni na obu podłożach tej płytki podwójnej. Płytką do posiewu służy przede wszystkim do izolowania czystych hodowli z próbek zawierających florę mieszaną. Innym sposobem, jeżeli materiał jest hodowany bezpośrednio z wymazu, jest przetoczenie wymazówki po niewielkiej powierzchni krawędzi płytki, a następnie posiew pasmowy z inokulowanego obszaru w celu uzyskania pojedynczych kolonii. Należy także wykonać posiew na podłożu mniej selektywnym (np. **BD MacConkey II Agar**) oraz na selektywnej płynnej pożywce wzbogacającej (np. Selenite F Broth) w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wyhodowania drobnoustrojów w przypadku, gdy populacja bakterii Gram-ujemnych jest mała, a także w celu wykrycia innych organizmów występujących w próbce. Pełne omówienie technik izolowania i identyfikacji patogenów jelitowych z próbek klinicznych przedstawiono w poniższych publikacjach.⁶⁻⁸

Podłoże na płytce podwójnej **BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)** może być wykorzystywane do wykonywania kolejnych posiewów z pożywki Selenite F Broth. Płytki inkubować bez dostępu światła w temperaturze 35 ± 2 °C przez okres 18–24 godz. W przypadku ujemnego wyniku posiewu inkubować płytki przez kolejne 18–24 godz.

Wyniki

Typowa charakterystyka kolonii bakterii na podłożu na płytce podwójnej **BD DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)** jest następująca:

Drobnoustroje	DCLS Agar, Modified	Hektoen Enteric Agar
<i>E. coli</i>	Duże, płaskie, różowe do czerwonych z obszarem osadu soli kwasów żółciowych	Duże, barwa żółta do łososiowej; niektóre szczepy mogą ulegać zahamowaniu
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Duże, śluzowe, różowe	Duże, barwa żółta do łososiowej
<i>Proteus</i>	Bezbarwne do czerwonych	Zmienne, barwa niebieskozielona do niebieskiej lub łososiowa, większość szczepów z czarnym środkiem
<i>Salmonella</i>	Bezbarwne do białoróżowych	Niebieskozielone do niebieskich, większość szczepów z czarnym środkiem
<i>Shigella</i>	Bezbarwne do białoróżowych	Zielone i wilgotne, uniesione
<i>Pseudomonas</i>	Bezbarwne do brązowych lub zielonych	Nieregularne, barwa zielona do brązowej
Gram-dodatnie	Brak wzrostu	Brak wzrostu lub niewielki wzrost

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA I OGRANICZENIA PROCEDURY

Podłoże na płytce podwójnej **DCLS Agar, Modified / Hektoen Enteric Agar (Biplate)** służy do izolowania bakterii z rodzajów *Salmonella* i *Shigella* z próbek kału ludzkiego i wymazów z odbytu.^{3,6-9}

Jeśli patogenów w próbce jest niewiele, mogą one nie zostać wykryte na podłożu wysoce selektywnym. Zaleca się użycie również podłoża o mniejszej selektywności, np. **BD MacConkey II Agar** lub płynnego selektywnego środka wzbogacającego.⁶⁻⁸

Kolonie *Proteus mirabilis* mogą przypominać na tym podłożu kolonie *Salmonella*. Niektóre szczepy *Shigella* mogą wymagać inkubacji przez 42–48 godz.

Wprawdzie pewne testy diagnostyczne można wykonywać bezpośrednio na opisywanym podłożu, jednak w celu przeprowadzenia pełnej identyfikacji konieczne jest wykonanie badania biochemicznego oraz, jeśli jest to wskazane, badania immunologicznego z użyciem czystych hodowli.

Kolonie przypominające *Salmonella* lub *Shigella* należy zbadać dla potwierdzenia i zidentyfikować serologicznie.⁶

Ponieważ wymagania drobnoustrojów co do substancji odżywczych są różne, niektóre szczepy mogą na tych podłożach nie wzrastać lub wzrastać słabo.

PIŚMIENNICTWO

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.

OPAKOWANIE/DOSTĘPNOŚĆ

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

Nr kat. 254553

Podłoża na płytkach, gotowe do użycia, 20 sztuk

DODATKOWE INFORMACJE

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



Becton Dickinson GmbH

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

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

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

© 2011 BD