



## BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood

### VERWENDUNGSZWECK

**BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood** (Clostridium-Difficile-Agar mit 7 % Schafblut) ist ein selektives Medium zum Erstisolierung von *Clostridium difficile* aus Stuhlproben und anderen klinischen Proben.

### GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

*Clostridium difficile* gilt als einer der häufigsten Auslöser von Antibiotika-assoziiierter Kolitis und pseudomembranöser Kolitis (PMK)<sup>1</sup>. Für die Isolierung von *C. difficile* sind eine Reihe von Verfahren entwickelt worden.<sup>2-4</sup> Im Jahre 1979 haben George et al. ein Medium mit dem Namen CCFA (Cycloserin-Cefoxitin-Fructose-Agar) entwickelt, ein blutfreies Medium basierend auf der von McClung und Toabe entwickelten Eigelb-Agar-Rezeptur, in welchem die Glucose durch Fructose ersetzt wurde.<sup>5</sup> **BD Clostridium Difficile Agar mit 7% Sheep Blood** ist eine Modifikation der ursprünglichen CCFA-Rezeptur. Die Peptonkonzentration wurde auf einen mit anderen für *C. difficile* verwendeten Medien vergleichbaren Gehalt verringert, während der Cycloserin- und Cefotixin-Gehalt reduziert wurde, da die ursprüngliche Rezeptur eine allzu hemmende Wirkung zeigte.<sup>6</sup> Das Eigelb wurde weggelassen, da *C. difficile* lecithinase- und lipase-negativ ist und das Medium die meisten anderen Clostridien hemmt. Das Schafblut liefert die Nährstoffe und erlaubt eine gute Sporulation und den Nachweis einer grünlichen Fluoreszenz unter Langwellen-UV-Licht.<sup>7,5</sup>

Pepton und Fructose liefern die notwendigen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. Phosphate erhalten den pH-Wert aufrecht. Cycloserin und Cefoxitin sind selektive Agenzien zur Unterdrückung von begleitenden Bakterien.

### REAGENZIEN

#### **BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood**

Zusammensetzung\* pro 1 Liter destilliertem Wasser

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Peptisch abgebautes Tiergewebe | 32,0 g |
| Fructose                       | 6,0    |
| Kaliumdihydrogenphosphat       | 1,0    |
| Dinatriumphosphat              | 5,0    |
| Natriumchlorid                 | 2,0    |
| Magnesiumsulfat                | 0,1    |
| Cycloserin                     | 0,5    |
| Cefoxitin                      | 0,016  |
| Agar                           | 20,0   |
| Schafblut, defibriniert        | 7 %    |

pH 7,2 ± 0,3

\*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.

## AUFBEWAHRUNG 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 GEBRAUCHSANLEITUNGEN**). Platten 48 – 72 h bei 35 – 37 °C anaerob inkubieren.

| Stämme                                    | Wachstum                                                                                 |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Clostridium difficile</i> ATCC™ 9689   | Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum, graue Kolonien mit gewölbten Rändern, keine Hämolyse |
| <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 | Teilweise bis vollständig gehemmtes Wachstum, Beta-Hämolyse                              |
| <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285    | Vollständig gehemmtes Wachstum                                                           |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922        | Vollständig gehemmtes Wachstum                                                           |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453       | Vollständig gehemmtes Wachstum                                                           |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923   | Vollständig gehemmtes Wachstum                                                           |
| Nicht inokuliert                          | Rot (blutfarben)                                                                         |

## VERFAHREN

### Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

**BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood** (90 mm **Stacker™**-Platten).

Mikrobiologisch kontrolliert.

### Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

### Probenarten und Probenentnahme

Dieses Medium wird zur Isolierung von *C. difficile* aus Fäkalproben verwendet. Frische Stuhlproben (idealerweise 10 – 20 mL wässriger Stuhl) von Patienten mit Verdacht auf pseudomembranöse Kolitis (PMK) sind zu verwenden. Die Ergebnisse von Tests mit festem, geformtem Stuhl werden wahrscheinlich nicht zur Diagnose von PMK beitragen. Besonders hospitalisierte Patienten, welche während oder kurz nach einer Antibiotikatherapie Durchfall entwickeln, sollten auf eine Infektion mit *C. difficile* und PMK getestet werden. *Clostridium difficile* ist sehr sauerstoffempfindlich. Deshalb müssen die Stuhlproben frisch sein und innerhalb von 2 Stunden weiterverarbeitet werden, wenn keine anaeroben Transportmedien verwendet werden (siehe auch **LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN**). Wenn die Proben in anaerobe Transportmedium-Röhrchen gegeben werden, ist eine längere Transportzeit akzeptabel. 24 h sollten jedoch nicht überschritten werden. Proben nicht einfrieren!<sup>7,8</sup>

### Testverfahren

Proben möglichst bald nach Eingang im Labor auf **BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood** inokulieren und zur Isolierung ausstreichen. Da einige Stämme von *C. difficile* auf Grund der selektiven Eigenschaften des Mediums möglicherweise nur ein schwaches Wachstum zeigen, empfiehlt es sich, auch ein nicht selektives Medium, wie z.B. **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** oder **BD CDC Anaerobe Agar with 5% Sheep Blood** miteinzubeziehen. Da einige fakultative Anaerobier potenziell ähnliche Reaktionen hervorrufen wie *C. difficile*, wird ebenfalls die Anwendung einer aerob inkubierten Blutagar-Platte empfohlen, um zu bestätigen, dass es sich bei dem Isolat um einen obligaten Anaerobier handelt.

Anaerobe Medien sollten vor der Inokulation reduziert werden, indem sie vor Gebrauch 6 – 24 h einer anaeroben Umgebung ausgesetzt werden. Eine effiziente und einfache Art,

geeignete anaerobe Bedingungen zu erreichen, ist die Verwendung des anaeroben **BD GasPak** Systems.

Platten sofort 48 h bei 35 – 37 °C anaerob inkubieren. Ungeachtet des verwendeten anaeroben Systems ist es wichtig, einen Indikator der Anaerobiose einzuschließen, wie z.B. den anaeroben **BD GasPak** Einmalindikator.

### Ergebnisse

Nach einer Inkubationszeit von 48 – 72 h erscheint *Clostridium difficile* als grau-weiße Kolonien, im Aussehen gemahlenem Glas ähnelnd und mit leicht faserigem Rand, jedoch ohne Anzeichen von Beta-Hämolyse. Gut gewachsene Kulturen zeigen den charakteristischen „pferdestallartigen“ Geruch, welcher durch die Bildung von p-Cresol hervorgerufen wird. Wachstum mit einem Langwellen-UV-Licht auf grünliche Fluoreszenz überprüfen. Dies sollte innerhalb einer Stunde nach der Entnahme aus der anaeroben Atmosphäre gemacht werden. Nach der Exposition gegenüber Sauerstoff, können die Kolonien schnell absterben, was üblicherweise mit einem Verlust der Fluoreszenz einhergeht. Zur vollständigen Identifizierung der Isolate sind weitere Tests notwendig.<sup>7-13</sup>

### Interpretation der Ergebnisse

Da das Vorhandensein von *Clostridium difficile* in der Kultur ohne den Nachweis der Toxine A und B des Organismus nicht auf eine Antibiotika-assoziierte oder pseudomembranöse Kolitis schließen lässt, müssen mit der Stuhlprobe auch die geeigneten immunologischen Tests durchgeführt werden. Ebenfalls sollten die Ergebnisse im Zusammenhang mit den klinischen Beobachtungen interpretiert werden.<sup>14,15</sup>

### LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Dieses Plattenmedium ist eine der Standardrezepturen zur Erstisolierung von *Clostridium difficile*. Einige diagnostische Tests können auf der Primärisolierplatte durchgeführt werden. Zur Identifizierung muss der Mikroorganismus in Reinkultur vorliegen. Die vollständige Identifizierung kann auf Grund von Gramreaktion, Zellmorphologie, Sauerstoffempfindlichkeit, biochemischen Reaktionen, Empfindlichkeit auf antimikrobielle Agenzien und Gas-Flüssigkeit-Chromatographie der Stoffwechselprodukte erreicht werden.

Andere Clostridia-Spezies, z.B. *C. ramosum*, können auf diesem Medium Wachstum und Fluoreszenz zeigen. Außerdem sollte die etiologische Diagnose von pseudomembranöser Kolitis nicht allein auf der Isolierung von *Clostridium difficile* basieren (siehe auch

### Interpretation der Ergebnisse).<sup>14,15</sup>

Da es das perfekte Medium nicht gibt, können auch einige Stämme von *C. difficile* angetroffen werden, die auf diesem Medium nur ein schwaches Wachstum zeigen. Die Art der Proben und der physiologische Zustand der Organismen können die Isolierung der gewünschten Spezies beeinflussen, sowie die Wirkung der Hemmeigenschaften des Mediums verändern.

*Clostridium difficile* ist sehr sauerstoffempfindlich. Proben und Kulturen die über längere Zeit Sauerstoff ausgesetzt sind, verlieren schnell ihre Lebensfähigkeit.<sup>8</sup>

### LITERATUR

1. Bartlett, J.G., et al. 1978. Antibiotic- associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N. Engl. J. Med. 298:531-534.
2. Koransky, J.R., S.D. Allen, and V.R. Dowell, Jr. 1978. Use of ethanol for isolation of spore forming microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 35:762-765.
3. Kafiz, S., and C.L. Oakley. 1976. Clostridium difficile: isolation and characteristics. J. Med. Microbiol. 9:129-137.
4. Willey, S.H., and J.G. Barlett. 1979. Cultures for Clostridium difficile in stools containing a cytotoxin neutralized by Clostridium sordellii antitoxin. J. Clin. Microbiol. 10:880-884.
5. George, W.L., et al. 1979. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. 9:214-219.
6. Wüst, J., et al. 1982. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. J. Clin. Microbiol. 9: 214-219.

7. Allen, S.D., and E.J. Baron. 1991. *Clostridium*. In: Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.J., Isenberg, H.D., and H.J. Shadomy. Manual of Clinical Microbiology, 5<sup>th</sup> edition. American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA.
8. Onderdonk, A.B., and S.D. Allen. 1995. Clostridium, p. 574-586. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Dowell, V.R., Jr., and T.M. Hawkins. 1987. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC laboratory manual. HHS Publication No. (CDC) 87-8272. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Holdeman, L.V., E.P. Cato, and W.E.C. Moore (ed.). 1977. Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
11. Rodloff, A.C., P.C. Appelbaum, and R.J. Zabransky. 1991. Cumitech 5A, Practical anaerobic bacteriology. Coordinating ed., A.C. Rodloff. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Summanen, P., et al. 1993. Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 5th ed. Star Publishing Co., Belmont, Calif.
13. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
14. George, W.L., R.D. Rolfe, and S.M. Finegold. 1982. Clostridium difficile and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. J. Clin. Microbiol. 15:1049-1053.
15. Baron, E.J. 1989. Assessment of currently available laboratory tests for Clostridium difficile-associated diarrhea. Clin. Microbiol. Newsl. 11:118-120.

## **VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE**

### **BD Clostridium Difficile Agar with 7% Sheep Blood**

Best.-Nr. 254406

Gebrauchsfertige Plattenmedien, 20 Platten

## **WEITERE INFORMATIONEN**

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



### **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, GasPak and Stacker are trademarks of Becton, Dickinson and Company.

© 2011 BD