

## POSTUPCI KONTROLE KVALITETE

## I UVOD

**BD BBL *Clostridium difficile* Selective Agar (CDSA)** (Selektivni agar za *Clostridium difficile* (CDSA)) preporučuje se kao selektivni i diferencijalni medij za primarnu izolaciju bakterije *Clostridium difficile* iz fekalnih uzoraka.

## II POSTUPAK ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI

1. Stavite pločice na sobnu temperaturu na 6–24 h prije upotrebe u anaerobnom sustavu **BD GasPak EZ**.
2. Inokulirajte reprezentativne uzorke s dolje navedenim kulturama.
  - a. Za obligatne anaerobe razmažite inokulat 1 µL (0,001 mL) iz 48–72 h kulture nasjeckanog mesnog bujona (Chopped Meat Broth) koji je bio inkubiran 2 dana na temperaturi 35–37 °C.
  - b. Za *E. coli* i *P. mirabilis* razmažite inokulat 1 µL (0,001 mL) iz 4–5 h kulture **BD BBL Trypticase** sojinog bujona razrijeđenog da daje 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> CFU/mL.
  - c. Inkubirajte pločice pri temperaturi od 36 °C ± 1 °C u anaerobnoj atmosferi.
  - d. Uključite pločice prethodno testirane serije **BD Trypticase** sojinog agara s 5% ovčje krvi kao kontrole za inhibirane sojeve.
3. Nakon 48–72 h na pločicama pregledajte rast, boju kolonije, fluorescenciju i selektivnost.
4. Očekivani rezultati

Organizmi	ATCC	Izolacija	Boja kolonije	Fluorescencija
* <i>Clostridium difficile</i>	9689	Prosječan do velik rast	Blijedožuta do jarkožuta	Da†
<i>Clostridium difficile</i>	51695	Prosječan do velik rast	Blijedožuta do jarkožuta	Da†
* <i>Clostridium perfringens</i>	13124	Potpuna inhibicija	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Potpuna inhibicija	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
* <i>Proteus mirabilis</i>	12453	Potpuna inhibicija	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo

\*Preporučeni soj organizama za korisničku kontrolu kvalitete.

†Pregledajte kolonije na CDSA mediju medium dugovalnom (365 nm) UV lampom. Kolonije *Clostridium difficile* trebale bi proizvesti žutu fluorescenciju pod UV svjetlom do jedan sat nakon uklanjanja iz anaerobne atmosfere.

## III DODATNA KONTROLA KVALITETE

1. Pregledajte pločice prema objašnjenju iz poglavlja „Pogoršanje kvalitete proizvoda”.
2. Vizualno pregledajte reprezentativne pločice kako biste utvrdili da nemaju fizičkih oštećenja koja mogu utjecati na upotrebu.
3. Odredite pH potenciometrijski na sobnoj temperaturi kako biste provjerili pridržava li se propisanih vrijednosti 7,2 ± 0,2.
4. Obratite pažnju na čvrstoću pločica tijekom postupka inokulacije.
5. Inkubirajte neinokulirane reprezentativne pločice na 35 ± 2 °C na 72 sata te potražite znakove kontaminacije mikrobima.

## INFORMACIJE O PROIZVODU

## IV NAMJENA

**BD BBL *Clostridium difficile* Selective Agar (CDSA)** (Selektivni agar za *Clostridium difficile* (CDSA)) preporučuje se kao selektivni i diferencijalni medij za primarnu izolaciju bakterije *Clostridium difficile* iz fekalnih uzoraka.

## V SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Bakterija *Clostridium difficile* poznata je kao najčešći uzrok kolitisa povezanog s antibioticima i pseudomembranskog kolitisa (PMC-a).<sup>1</sup> Razvijeni su brojni postupci za izolaciju bakterije *C. difficile*.<sup>2-4</sup> George i suradnici 1979. razvijaju medij pod nazivom CCFA (agar cikloserin-cefoksitin-fruktoze), koji se temelji na McClungovoj i Toabeovoj formuli agara Egg Yolk u kojoj fruktoza zamjenjuje glukozu.<sup>5</sup> Naknadno je zabilježeno da koncentracija cikloserina i cefoksitina u izvornoj formuli CCFA djeluje inhibitory na bakteriju *C. difficile*.<sup>6</sup> Za kulturu *C. difficile* opisano je nekoliko modifikacija i drugih formula za CCFA. One uključuju dodavanje konjskog seruma, natrijevog taurokolata i medija s manitolom umjesto fruktoze.<sup>7</sup>

CDSA selektivan je diferencijalni medij koji je razvila tvrtka BD. Omogućuje dobru izolaciju bakterije *C. difficile* s jednakom ili boljom inhibicijom normalne flore u usporedbi s izmijenjenom formulom za CCFA tvrtke BD (agar **BD BBL *Clostridium difficile***). Prilikom razvoja bakterije *C. difficile* pH vrijednost medija raste, a neutralni crveni indikator postaje žut.

## VI NAČELA POSTUPKA

CDSA sadrži peptonsku bazu s 0,6% manitola. Sastojci su podešeni kako bi poboljšali izolaciju i veličinu kolonije bakterije *C. difficile*. *C. difficile* koristi aminokiseline prisutne u bazi agara, što uzrokuje povećanje pH vrijednosti. Kako pH vrijednost raste, kolonija i okolni medij mijenjaju boju iz ružičaste u žutu. Manitol koristi manji broj vrsta *Clostridium* od fruktoze te poboljšava izolaciju bakterije *C. difficile*. Cefoksitin i cikloserin dodani su za inhibiranje normalne fekalne flore. Ti antibiotici imaju širok raspon djelovanja protiv aerobnih, anaerobnih and fakultativno anaerobnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, a ujedno omogućuju izolaciju bakterije *C. difficile*. Kolonije bakterije *C. difficile* pod dugovalnim UV svjetlom proizvode žutu fluorescenciju.

## VII REAGENSI

### BD BBL *Clostridium difficile* Selective Agar (CDSA)

Peptična digestija životinjskog tkiva .....	32,0 g	Magnezijev sulfat .....	0,1 g
Manitol .....	6,0 g	Agar .....	20,0 g
Monokalijev fosfat .....	1,0 g	Neutralna crvena boja .....	0,03 g
Dinatrijev fosfat .....	5,0 g	Cikloserin .....	0,25 g
Natrijev klorid .....	2,0 g	Cefoksitin .....	0,016 g
Faktori rasta .....	3,3 g		

\* Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

**Upozorenja i mjere opreza:** Za *in vitro* dijagnostiku.

Primijeti li se suvišna vlaga, okrenite dno preko skinutog poklopca i omogućite da se osuši na zraku da bi se spriječilo brtvljenje između vrha i dna pločice tijekom inkubacije.

**Upute za čuvanje:** Pločice po primitku čuvajte na tamnom mjestu na temperaturi od 2 °C do 8 °C. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Otvorite neposredno prije upotrebe. Smanjite izlaganje svjetlosti na najmanju moguću mjeru. Pripremljene pločice pohranjene u originalnom pakiranju u obliku tuljca na temperaturi od 2 °C do 8 °C prije same upotrebe mogu se inkulirati sve do isteka roka valjanosti i inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije. Prije inkulacije pričekajte da se medij zagrije do sobne temperature.

**Pogoršanje kvalitete proizvoda:** Ne upotrebljavajte pločice ako su vidljivi znakovi kontaminacije mikroorganizmima, promjena boje, sušenje, pucanje ili ostali znakovi pogoršanja kvalitete.

## VIII PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE

Pojedinosti o postupcima prikupljanja uzoraka i rukovanju potražite u odgovarajućim tekstovima.<sup>8,9</sup>

U kliničkim uzorcima mogu biti prisutni patogeni mikroorganizmi, uključujući viruse hepatitisa i virus humane imunodeficijencije. Pri rukovanju svim predmetima kontaminiranim krvlju i drugim tjelesnim tekućinama treba se pridržavati „Standardnih mjera opreza“<sup>10-13</sup> i institucionalnih smjernica. Prije odlaganja spremnike u kojima su bili uzorci te druge kontaminirane materijale sterilizirajte u autoklavu.

## IX POSTUPAK

**Priloženi materijal:** BD BBL *Clostridium difficile* Selective Agar.

**Potreban materijal koji se nabavlja zasebno:** dodatne hranjive podloge, reagensi, organizmi za kontrolu kvalitete i laboratorijska oprema prema potrebi.

**Postupak ispitivanja:** Primjenjujte aseptične tehnike.

Površina agara trebala bi biti glatka i vlažna, ali bez suvišne vlage.

Po primitku u laboratorij, što je prije moguće inkulirajte uzorak na reduciranu pločicu CDSA i razmažite radi izolacije. Budući da se neki sojevi bakterije *C. difficile* ne razvijaju dobro zbog selektivnih svojstava medija, preporučuje se dodavanje neselektivnog medija kao što je CDC Anaerobe Blood Agar (anaerobni krvni agar CDC).

Medij treba reducirati prije inkulacije u anaerobnim uvjetima 6 do 24 h prije upotrebe.<sup>14</sup> Jednostavan i učinkovit način postizanja odgovarajućih anaerobnih uvjeta predstavlja upotreba anaerobnih sustava **BD GasPak EZ**.

Medij odmah inkubirajte u anaerobnim uvjetima ili ga stavite u staklenku napunjenu plinovima bez kisika dok se ne prikupi dovoljno pločica (ali ne duže od 3 h).<sup>15</sup> Inkubacija se treba odvijati na temperaturi od 35 ± 2 °C najmanje 48 h. Bez obzira koji se anaerobni sustav koristi, važno je uključiti i indikator anaerobnosti kao što je anaerobni indikator za jednokratnu upotrebu **BD GasPak**.

**Korisnička kontrola kvalitete:**

Zahtjevi kontrole kvalitete moraju biti ispunjeni u skladu s važećim lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima ili uvjetima akreditiranja i postupcima standardne kontrole kvalitete vašeg laboratorija. Preporučuje se da korisnik konzultira relevantne smjernice CLSI-a i propise CLIA za odgovarajuće postupke kontrole kvalitete.

## X REZULTATI

Nakon 48 do 72 h inkubacije *Clostridium difficile* izgledat će kao plošne klobučaste, žute kolonije oblog staklastog izgleda s nitastim rubovima. Kolonije bakterije *C. difficile* mogu biti obložene žutom zonom od otprilike 2–3 mm, ovisno o veličini kolonije i vremenu inkubacije. Za 1 h od uklanjanja iz anaerobne atmosfere moguće je ispitati prisutnost žute fluorescencije na rastu pod dugovalnim UV svjetlom. Nakon izlaganja zraku kolonije mogu postati nevjabilne, nakon čega obično dolazi do promjene boje natrag u ružičastu i gubljenja fluorescencije. Budući da neki fakultativno anaerobni organizmi mogu stvoriti reakcije slične bakteriji *C. difficile*, preporučuje se koristi aerobno inkubirana pločica kako bi se dokazalo da je izolat obilgatno anaerobni organizam.

## XI OGRANIČENJA POSTUPKA

Ovaj pripremljeni pločasti medij namijenjen je primarnoj izolaciji. Neka se dijagnostička ispitivanja mogu provoditi na rastu na primarnom pločastom mediju. Za identifikaciju organizma kultura mora biti čista. Potpunu identifikaciju moguće je provesti pomoću reakcije po Gramu, stanične morfologije, osjetljivosti na kisik, biokemijskih reakcija, osjetljivosti na protumikrobnih agensa i kromatografske analize plin-tekućine metaboličkih proizvoda. Neke vrste klostridije (npr., *butyricum*, *histolyticum*, *innocuum*, *sordellii* i *subterminale*) mogu rasti na ovom mediju i stvarati žute kolonije i fluorescenciju. Isto tako, izolacija bakterije *Clostridium difficile* ne smije ovisiti o etiološkoj dijagnozi pseudomembranskog kolitisa.<sup>16</sup> Treba provoditi druga ispitivanja, kao što je brzo ispitivanje toksina A za *C. difficile* **BD ColorPAC**, brzo ispitivanje lateks aglutinacije za antigene *C. difficile* (Komplet **BD Culturette CDT**) te koristiti analize toksina te klinička zapažanja.<sup>17</sup> Za dodatne informacije pogledajte odgovarajuće reference.<sup>18-23</sup>

Budući da savršeni medij ne postoji, rast nekih sojeva bakterije *C. difficile* može biti slab na ovom mediju. Svojstva uzorka i fiziološko stanje organizma može utjecati na izolaciju željenih vrsta, kao i na inhibitorne karakteristike medija.

## XII RADNA SVOJSTVA

Provedno je kliničko ispitivanje na 800 uzoraka stolice s usporedbom izolacije na agarima CDSA i CCFA. Od 100 uzoraka pozitivnih na *C. difficile*, na agaru CDSA izolirano je 98 (98%), a na CCFA 86 (86%). Agar CDSA pokazao je veću od agara CCFA. Agar CDSA imao je 15% manje uobičajene flore od agara CCFA. Pozitivne kulture uspoređene su s obzirom na veličinu kolonije, morfologiju i rast. Kolonije *C. difficile* bile su veće na agaru CDSA (7,30 mm) od onih na CCFA (5,78 mm). Morfologija kolonije bila je slična na oba medija. Na agaru CDSA je zabilježeno 10% veći broj *C. difficile* od zabilježenog na agaru CCFA.

Selektivnost je procijenjena interno pomoću 43 soja (kliničkih i ATCC), bez klostridije, koji predstavljaju organizme u flori iz stolice te 53 soja različitih vrsta bakterije *Clostridium* (kliničkih i ATCC), uključujući 9 sojeva *C. difficile*. Od 43 soja bez klostridije 32 je bilo potpuno inhibirano. Djelomična inhibicija uočena je kod vrsta *Candida*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. i *Serratia* spp. Kolonije tih vrsta nisu bile žute niti su imale tipičnu morfologiju te ih je bilo jednostavno razlikovati od *C. difficile*. Trideset i pet od 44 vrste *Clostridium* bez *C. difficile* potpuno su inhibirane. Kod vrsta *C. butyricum*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. sordellii* i *C. subterminale* došlo je do rasta koji ukazuje na prisutnost *C. difficile*. Izolacija na CDSA i CCFA bila je jednaka. Klinički sojevi u usporedbi s ATCC sojevima iste vrste postigli su veći broj. Ponovljeno ispitivanje pomoću ATCC sojeva i kliničkih sojeva svake vrste potvrdio je inhibiciju ATCC sojeva, izuzev *C. butyricum* i *C. sordellii*, te izolaciju navedenih vrsta s kliničkim sojevima. Svi sojevi *C. difficile* izolirani su te su pokazali tipičnu morfologiju.

## XIII DOSTUPNOST

**Kat. br. Opis**

222228 **BD BBL *Clostridium difficile* Selective Agar**

## XIV REFERENCE

1. Bartlett, J.G., T.W. Chang, M. Gurwith, S.L. Gorbach, and A.B. Onderdonk. 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. Bartlett. 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., V.L. Sutter, D. Citron, and S.M. Finegold. 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 9:214-219.
6. Wust, J., N.M. Sullivan, U. Hardegger, and T.D. Wilkins. 1982. Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 16:1096-1101.
7. Dowell, V.R., Jr. 1981. Media for the selective isolation of *Clostridium difficile*. *Les Anaerobes Microbiologie-Pathologie. Symposium International.* New York.
8. Isenberg, H.D., F.D. Schoenkecht, and A. von Graevenitz. 1979. Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Miller, J.M., and H.T. Holmes. 1995. Specimen collection, transport, and storage, p. 19-32. 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.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
11. 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.
12. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
13. 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.
14. Allen, S.D., J.A. Siders, and L.M. Marler. 1985. Isolation and examination of anaerobic bacteria, p. 413-433. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and H.J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
15. Martin, W.J. 1971. Practical method for isolation of anaerobic bacteria in the clinical laboratory. *Appl. Microbiol.* 22:1168-1171.
16. George, W.L., R.D. Rolfe, and S.M. Finegold. 1982. *Clostridium difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial-associated diarrhea and miscellaneous conditions. *J. Clin. Microbiol.* 15:1049-1053.
17. Baron, E.J., Assessment of currently available laboratory tests for *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Clin. Microbiol. Newsl.* 11:118-120.
18. 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.
19. 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.
20. Rodloff, A.C., P.C. Applebaum, and R.J. Zabransky. 1991. Cumitech 5A, Practical anaerobic bacteriology. Coordinating ed., A.C. Rodloff, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
21. Summanen, P., E.J. Baron, D.M. Citron, C.A. Strong, H.M. Wexler, and S.M. Finegold. 1993. Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 5th ed. Star Publishing Co., Belmont, Calif.
22. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 1998. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
23. Allen, S.D., C.L. Emery, and J.A. Siders. 1999. *Clostridium*, p. 654-671. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Tehnički servis i podrška: obratite se lokalnom predstavniku tvrtke BD ili posjetite [www.bd.com](http://www.bd.com).



Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited  
Pottery Road, Dun Laoghaire  
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.