

**ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ**

ΠΡΟΪΟΝ: **CLOSTRIDIUM DIFFICILE AGAR**
CCEY (Brazier's)
 ΚΩΔΙΚΟΣ: **010035**



Ημ. 1^{ης} Έκδοσης:
 7ος 2009
 Ημ. Αναθεώρησης:
 4ος 2024

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το Brazier's CCEY Agar είναι η φόρμουλα που χρησιμοποιείται τώρα από το "Anaerobe Reference Unit" για την απομόνωση του *C. difficile* σαν αποτέλεσμα της εργασίας που ξεκίνησε ο Ken Phillips, με τον Paull Levett και ολοκλήρωσε ο Jon Brazier.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το *Clostridium difficile* είναι η κύρια αιτία νοσοκομειακής μολυσματικής διάρροιας σε ενήλικες. Αυτές οι λοιμώξεις εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς που έχουν τόσο ιατρική φροντίδα όσο και θεραπεία με αντιβιοτικά. Τα συμπτώματα της μόλυνσης από *C. difficile* είναι ο πυρετός, οι κοιλιακές κράμπες και η σοβαρή διάρροια που οδηγεί σε θάνατο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, σχεδόν 250.000 άνθρωποι προσβάλλονται από *C. difficile* με τουλάχιστον 14.000 θανάτους (εκτίμηση CDC, 2013). Λόγω της εμφάνισης του εξαιρετικά τοξικογόνου στελέχους *C. difficile*, αυτές οι μολύνσεις έχουν γίνει πιο συχνές και πιο δύσκολες στη θεραπεία τους τα τελευταία χρόνια. Αν και η PCR έχει καταστεί η κορυφαία τεχνική ανίχνευσης *C. difficile*, η καλλιέργεια είναι απαραίτητη για την τυποποίηση των στελεχών και για τη δοκιμή ευαισθησίας κατά της μικροβιακής αντοχής.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Βασισμένο πάνω στο αναερόβιο υλικό που ηγείται στην αγορά "Fastidious Anaerobe Agar", ενσωματώνει επιπλέον συστατικά έτσι ώστε να βελτιώσει την απομόνωση και διαφοροποίηση του *C. difficile* από κλινικά δείγματα. Χολικά οξέα είναι παρόντα για να προωθήσουν την εκβλάστηση των σπόρων ακολουθώντας την μέθοδο του "σοκ της αλκοόλης" και επίσης p-υδροξυφαινυλακετικό οξύ για να εντείνει την παραγωγή του p-cresol, ένα διακριτικό προϊόν μεταβολισμού του *C. difficile*. Η εκλεκτικότητα επιτυγχάνεται με την προσθήκη του εμπλουτιστικού Cefoxitin – Cycloserine (αναστέλλονται *Staphylococci*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, gram(-) αναερόβιοι *βάκιλοι* και *Clostridium* sp). Το γαλάκτωμα κρόκου αυγού προστίθεται για να βοηθήσει στη διαφοροποίηση του *C. difficile* από τα *Λεκιθινάση* θετικά *Κλωστηρίδια*. Τέλος η προσθήκη των αιμολυμένων ερυθρών αλόγου αποτελεί ένα σημαντικό θρεπτικό συμπλήρωμα και επιπλέον βοηθάει την διάκριση των αποικιών στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV λάμπα).

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
Peptone Mix	23.0
Sodium chloride	5.0
Soluble Starch	1.0
Agar	12.0
Sodium bicarbonate	0.4
Glucose	1.0
Sodium pyruvate	1.0
Cysteine HCl	0.5
Haemin	0.01
Vitamin K	0.001
L-arginine	1.0
Soluble pyrophosphate	0.25
Sodium succinate	0.5
Cholic acid	1.0
p-Hydroxyphenylacetic acid	1.0
Egg yolk Emulsion	40ml
Lysed Horse Blood	10ml
D-Cycloserine	250 mg
Cefoxitin	8 mg

Εμφάνιση: Πορτοκαλή ανοιχτό μη διαυγές

Τελικό pH 7.0 ± 0.2 στους 25 °C.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Το CLOSTRIDIUM DIFFICILE AGAR είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό υλικό και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου. Το υλικό αυτό περιέχει πεπτόνες και εκχυλίσματα ζωικής προέλευσης. Τα πιστοποιητικά για την προέλευση και την υγειονομική κατάσταση των ζώων δεν εγγυόνται πλήρως την απουσία μεταδιδόμενων παθογόνων παραγόντων. Γι' αυτό συνιστάται αυτά τα υλικά να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά και με τήρηση των συνήθων μέτρων ασφαλείας (να μη λαμβάνονται από την πεπτική ή την αναπνευστική οδό). Ο χειρισμός των τρυβλίων να γίνεται πάντα με γάντια και μέσα σε Laminar flow Class II, για να αποφεύγονται επιμολύνσεις κυρίως από σαπροφυτικούς μύκητες. Μη χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια εάν παρουσιάσουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης. Μετά την ημερομηνία λήξεως το υλικό είναι ακατάλληλο για χρήση. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλύνουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι. Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Τα τρυβλία πρέπει να φυλάσσονται στους 2 – 12 °C μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους. Η κατάψυξη ακόμα και στιγμιαία, καταστρέφει το υλικό. Επίσης να αποφεύγεται την υπερβολική θέρμανση. Τα τρυβλία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

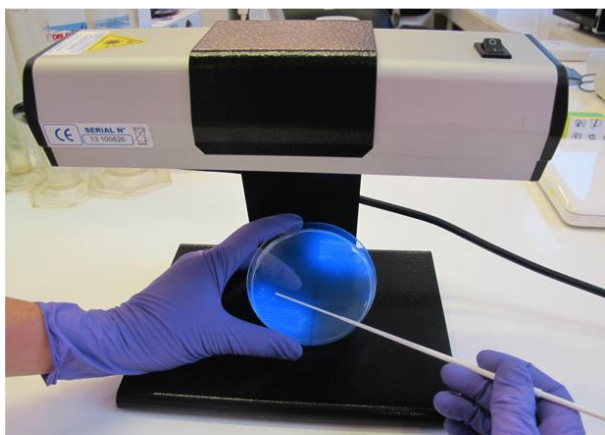
Εάν ανοίξετε την αεροστεγή συσκευασία του τρυβλίου κατά λάθος, μπορείτε να το φυλάξετε στο ψυγείο για **5 – 7 μέρες** αφού το σφραγίσετε με παραφίλμ ή με σακουλάκι. Για την μεταφορά οι μελέτες σταθερότητας μας έδειξαν ότι τα σωληνάρια μπορούν να παραμείνουν στους **6 - 25 °C** για **3 ημέρες** ή στους **25 - 40 °C** για **24 ώρες**, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

Ενοφθαλμίστε, απλώνοντας το δείγμα πάνω στην επιφάνεια του υλικού με διαδοχικές αραιώσεις. Επωάστε για 24 - 48 ώρες στους 35 - 37 °C σε αναερόβιες συνθήκες. Παρατηρήστε τις αποικίες και συμβουλευτείτε τον πίνακα.

ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Οι αποικίες του *C. difficile* είναι γκρι, αδιαφανείς, διαμέτρου 2-3 mm συνήθως κυκλικές με τάση να επιμηκύνονται έως να εξαπλώνονται, με εμφάνιση γυαλιού με άκρες σαν κρόσια. Είναι λεκιθινάση αρνητικές κι έχουν μυρωδιά φαινόλης η οποία οφείλεται στην παραγωγή p-cresol. Επώαση περισσότερο από 48 ώρες μπορεί να οδηγήσει σε αποικίες πιο ανοιχτόχρωμες γκρι ή με λευκό κέντρο. Οι αποικίες φωσφορίζουν (κίτρινο - πράσινο) κάτω από λάμπες UV στα 365 nm. Άλλα αναερόβια βακτήρια που μπορεί να αναπτυχθούν εμφανίζουν άχρωμες αποικίες χωρίς φθορισμό.

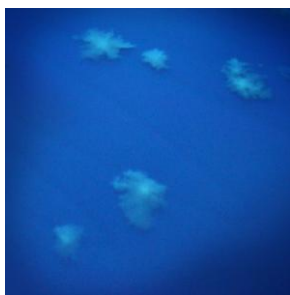


ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τελική ταυτοποίηση πρέπει να γίνεται με βιοχημικούς και ορολογικούς ελέγχους. (π.χ., δοκιμή συγκόλλησης **Microgen C. Difficile Latex Test, κωδικός: M41CE**) και μπορεί να εκτελούνται απευθείας από τις ύποπτες άχρωμες αποικίες *Clostridium* που φθορίζουν στο υπεριώδες φως. Μια δοκιμή οξειδάσης (Oxidase Test Strips-Code MID-61G) μπορεί να πραγματοποιηθεί απευθείας στην ύποπτη αποικία. Ορισμένα Gram (-) αρνητικά βακτηρίδια ανθεκτικά στους αναστολές του υλικού μπορεί να αναπτυχθούν και να δώσουν ψευδώς θετικές αποικίες.

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Μικροοργανισμός	ATCC	Χαρακτηριστικά αποικιών
<i>Clostridium difficile</i>	9689	Αναπτύσσεται (γκρι, αδιαφανείς)
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	Αναστέλλεται
<i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Αναστέλλεται
<i>Escherichia coli</i>	25922	Αναστέλλεται
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Αναστέλλεται



Clostridium difficile

ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Τα υλικά που δεν παρουσιάζουν καμία ανάπτυξη μπορεί να θεωρηθούν ως μη επικίνδυνα απόβλητα και να απορρίπτονται ανάλογα. Τα υλικά που παρουσιάζουν ανάπτυξη αποικιών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις οδηγίες για μολυσματικά ή δυνητικός μολυσματικά απόβλητα. Το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για τη σωστή διαχείριση των μολυσματικών αποβλήτων σύμφωνα με τη φύση και το βαθμό επικινδυνότητάς τους και πρέπει να τα διαχειρίζεται και να τα απορρίπτει (ή να αναθέτει τη διαχείριση και απόρριψή τους) σύμφωνα με τους εκάστοτε ισχύοντες κανονισμούς.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

CLOSTRIDIUM DIFFICILE AGAR CCEY (Brazie's)

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Τρυβλίο 9cm	010035	10 τεμάχια	2 - 12 °C	2 μήνες

Παράγεται στην Ελλάδα από την εταιρεία Bioprepare σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/746.

ΒΑΣΙΚΟ UDI-DI: 5212037714010401WF. EDMA (14 01 04 01) non-chromogenic media (Plates).

Η εταιρεία Bioprepare έχει πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα: EN ISO 9001:2015 / ΕΛΟΤ EN ISO 13485:2016 ΔΥ86/1348/2004.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Brazier J.S. (1993) Rôle of the Laboratory in Investigations of Clostridium difficile Diarrhoea. Clinical Infectious Diseases 16 (4) 228-33.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ IN VITRO

Bioprepare
microbiology



Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ & ΣΙΑ Ε.Ε.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ποταμού 5 ΒΙΟ ΠΑ ΚΕΡΑΤΕΑΣ - ΑΤΤΙΚΗ ΤΚ 19001

Τ.Θ. 4893 - Τηλ.: 2299 0 66113 Φαξ: 2299 0 66112.

E-mail: bioprep1@otenet.gr www.bioprepare.gr



TECHNICAL DATA SHEET

PRODUCT: **CLOSTRIDIUM DIFFICILE AGAR**
CCEY (Brazier's)
 REFERENCE: **010035**



Date 1st Edition:
 7th 2009
 Date 4rth Revision:
 6th 2024

DESCRIPTION

Brazier's CCYE Agar is the formula currently used by the "Anaerobe Reference Unit" for the isolation of *C. difficile*, because of work initiated by Ken Phillips, with Paull Levett, and completed by Jon Brazier.

INTRODUCTION

Clostridium difficile is the leading cause of hospital-acquired infectious diarrhea in adults. These infections primarily occur in patients receiving medical care and antibiotic treatment. Symptoms of *C. difficile* infection include fever, abdominal cramps, and severe diarrhea that can lead to death. In the United States, nearly 250,000 people are affected by *C. difficile*, with at least 14,000 deaths (CDC estimate, 2013). Due to the emergence of a highly toxigenic strain of *C. difficile*, these infections have become more frequent and more difficult to treat in recent years. Although PCR has become the leading technique for detecting *C. difficile*, culture is essential for strain typing and antimicrobial resistance testing.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Based on the market-leading anaerobic medium "Fastidious Anaerobe Agar," this medium incorporates additional ingredients to improve the isolation and differentiation of *C. difficile* from clinical specimens. Bile acids are present to promote the germination of spores following the alcohol shock method, and p-hydroxyphenylacetic acid is included to enhance the production of p-cresol, a distinctive metabolic product of *C. difficile*. Selectivity is achieved through the addition of the Cefoxitin – Cycloserine enrichment supplement (inhibiting *Staphylococci*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, gram-negative anaerobic bacilli, and *Clostridium* species). Egg yolk emulsion is added to assist in differentiating *C. difficile* from lecithinase-positive Clostridia. Finally, the addition of lysed horse blood serves as an important nutritional supplement and also aids in distinguishing colonies under ultraviolet light (UV lamp).

COMPOSITION	g/litre
Peptone Mix	23.0
Sodium chloride	5.0
Soluble Starch	1.0
Agar	12.0
Sodium bicarbonate	0.4
Glucose	1.0
Sodium pyruvate	1.0
Cysteine HCl	0.5
Haemin	0.01
Vitamin K	0.001
L-arginine	1.0
Soluble pyrophosphate	0.25
Sodium succinate	0.5
Cholic acid	1.0
p-Hydroxyphenylacetic acid	1.0
Egg yolk Emulsion	40ml
Lysed Horse Blood	10ml
D-Cycloserine	250 mg
Cefoxitin	8 mg

Appearance: Light orange, non-transparent

Final pH 7.0 ± 0.2 at 25 °C.

PRECAUTIONS

CLOSTRIDIUM DIFFICILE AGAR is an in vitro diagnostic laboratory material and should only be handled by trained laboratory personnel. This material contains peptones and extracts of animal origin. Certificates regarding the source and health status of the animals do not fully guarantee the absence of transmissible pathogens. Therefore, these materials should be treated as potentially infectious and handled using standard safety precautions (avoid ingestion and inhalation). Always handle plates wearing gloves and within a Class II laminar flow cabinet to prevent contamination, especially by saprophytic fungi. Do not use plates that show signs of microbial contamination. The material should not be used after the expiration date. In case of skin contact, wash immediately with plenty of water and soap. Positive samples must be disposed of according to the appropriate hygiene regulations for infectious materials.

STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

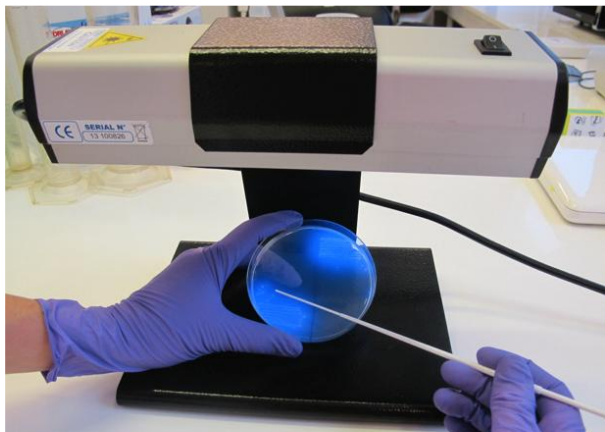
The plates should be stored at **2–12 °C** in their original packaging until use. Freezing, even briefly, damages the material. Avoid excessive heat as well. Plates may be used until the expiration date indicated on the label. If the airtight package is accidentally opened, the plate can be stored in the refrigerator for **5–7 days** if sealed with Parafilm or a bag. For transport, our stability studies showed that the plates can be maintained at **6–25 °C** for **3 days** or at **25–40 °C** for **24 hours** without affecting product performance.

INSTRUCTIONS FOR USE

Inoculate the sample onto the surface of the medium using successive dilution streaking. Incubate for 24–48 hours at 35–37 °C under anaerobic conditions. Observe the colonies and consult the interpretation table.

READING AND INTERPRETATION

C. difficile colonies appear gray, opaque, 2–3 mm in diameter, usually round with a tendency to elongate or spread, having a glassy appearance with fringed edges. They are lecithinase-negative and have a characteristic phenol odor due to p-cresol production. Incubation beyond 48 hours may result in lighter gray colonies or colonies with a white center. Colonies fluoresce (yellow green) under UV light at 365 nm. Other anaerobic bacteria that may grow on the medium usually produce colorless, non-fluorescent colonies.

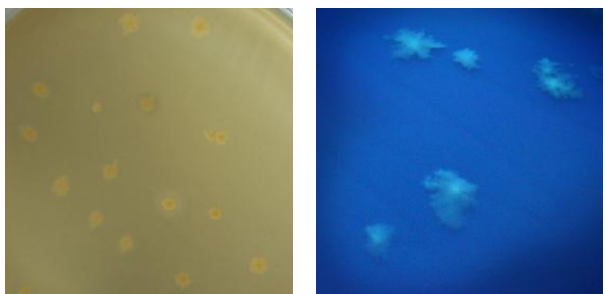


METHOD LIMITATIONS

Final identification must be confirmed using biochemical and serological tests (e.g., **Microgen C. difficile Latex Test, code: M41CE**), which can be performed directly on suspicious, colorless *Clostridium* colonies that fluoresce under UV light. An oxidase test (Oxidase Test Strips – Code MID-61G) can also be performed directly on the suspicious colony. Certain Gram-negative bacteria that are resistant to the medium's selective agents may grow and produce false-positive colonies.

GENERAL QUALITY CONTROL CHARACTERISTICS

Microorganism	ATCC	Colony Characteristics
<i>Clostridium difficile</i>	9689	Grows (gray, opaque)
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	Inhibited
<i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Inhibited
<i>Escherichia coli</i>	25922	Inhibited
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Inhibited



Clostridium difficile

WASTE DISPOSAL OF WASTE

Materials that show no growth can be considered as non-hazardous waste and disposed of accordingly. Materials that show colony growth must be disposed of according to the guidelines for infectious or potentially infectious waste. The laboratory is responsible for the proper management of infectious waste according to its nature and level of risk and must handle and dispose of it (or assign its management and disposal) in compliance with the applicable regulations.

SPECIFICATIONS

CLOSTRIDIUM DIFFICILE AGAR CCEY (Brazie's)

ITEM	CODE	PACKAGE	STORAGE	SHELF LIFE
9 cm Petri Dish	010035	10 pieces	2 – 12 °C	2 months

Manufactured in Greece by Bioprepare in accordance with Regulation (EU) 2017/746. Basic UDI-DI: 5212037714010401WF EDMA (14 01 04 01): Non-chromogenic media (Plates). Bioprepare is certified according to the standards: EN ISO 9001:2015 / ELOT EN ISO 13485:2016 / DY86/1348/2004

REFERENCES

Brazier J.S. (1993) Rôle of the Laboratory in Investigations of *Clostridium difficile* Diarrhoea. Clinical Infectious Diseases 16 (4) 228-33.

IN VITRO MANUFACTURER'S DATA



G. PAPANIKOLAOU & CO

PRODUCTION LABORATORIES OF CULTURE MEDIA

Potamou 5, Industrial Area Keratea, Attica

P.O. Box: 4893, Postal Code: 9001 - Tel: +30 2299066113. Fax: +30 2299066112

E-mail: bioprep1@otenet.gr www.bioprepare.gr