

CRONOBACTER-CHROMOGENER-AGAR

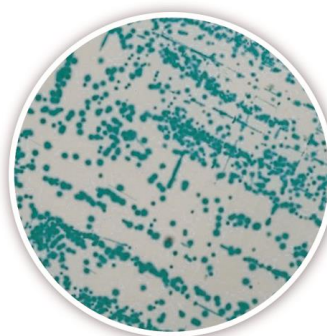
Selektivmedium zur Detektion von *Cronobacter* (früher *Enterobacter*) *sakazakii* in Milchpulver und Trockenmilchpulver für Kinder

ISO 22964:2017

2997

Zusammensetzung in g/l:

Caseinpepton (Pankreashydrolysat)	7,0
Natriumchlorid	5,0
Hefeextrakt	3,0
Natriumdesoxycholat	0,25
Chromogene	0,15
Natriumthiosulfat	1
Ammonium Eisen(III) citrat	1
Agar	15,0
pH-Wert	7,3 ± 0,2



Cronobacter
(*Enterobacter*) *sakazakii*

Lagertemperatur: 2-8 °C

HERSTELLUNG

32,4 g des Mediums werden in 1 l destilliertem Wasser suspendiert und gut gemischt. Zum besseren Lösen unter Rühren erhitzen und ca. 1 min. aufkochen bis das Medium vollständig gelöst ist. Man sterilisiere für 15 min. bei 121 °C im Autoklaven. Auf 45-50 °C abkühlen lassen, nochmals vorsichtig mischen und in Petrischalen gießen. Das fertige Medium ist bernstein-farben und sollte kühl und dunkel (ca. 10 °C) aufbewahrt werden.

EINSATZGEBIET

Cronobacter-Chromogener-Agar ist ein selektives Medium zur Detektion von *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in Milchpulver und Milchprodukten für Kleinkinder. Die ISO-Norm 22964 empfiehlt dieses Medium zur Isolation von *Cronobacter* spp. *Cronobacter* ist ein gram-negatives, ubiquitäres Stäbchenbakterium, das praktisch überall vorkommen kann, bei gesunden Erwachsenen keine große pathogene Rolle spielt. Für nicht gestillte Säuglingen stellt es allerdings ein wichtiges Pathogen dar, welches schwere Fälle von Meningitis und Nekrotischer Enterocolitis mit Mortalitätsraten von 40 bis 80 % hervorruft. Es ist daher dringend geboten, die Produktionsprozesse von Milchprodukten – vor allem solchen für Kleinkinder – zu kontrollieren, um zu gewährleisten, dass das Bakterium im Endprodukt nicht vorkommt.

Nach der Inkubation in einem Standard- oder Anreicherungsmedium werden ca. 10 µl der Bakteriensuspension auf einer Cronobacter-Chromogener-Agar Platte ausgestrichen, diese bei 44 °C ± 1 °C für 24 h ± 2 h inkubiert und danach auf die Anwesenheit möglicher *Cronobacter*-Kolonien über Pigmentbildung analysiert. Durch die hohe Bebrütungstemperatur von 44 °C werden gram-positive Bakterien wirkungsvoll inhibiert.

Das Medium enthält als chromogenes Substrat das α-D-Glucopyranosid, das von der bakterieneigenen α-D-Glucosidase umgesetzt wird und somit über die blaue Farbbildung die Identifikation ermöglicht. Typische *Cronobacter*-Kolonien sind klein bis mittelgroß und grün bis blau-grün, zuweilen cyan, gefärbt (s.u.).

Andere Enterobakterien wachsen in farblos, hell beige-farbenen bis leicht rötlichen, rot/violett gefärbten, oft leicht transparenten Kolonien. Vermutete *Cronobacter*-Kolonien sollten durch ihre gelbe Farbe auf CASO-Agar (Best.-Nr. X937) und biochemische Tests bestätigt werden.

MIKROBIOLOGISCHE TESTS

Die folgenden Ergebnisse wurden erzielt nach Inkubation von Referenzstämmen bei einer Temperatur von 44 °C ± 1 °C für 24 ± 2h. Die Temperatur muss genau kontrolliert werden, da bei Temperaturen über 45 °C das Wachstum von *Cronobacter* inhibiert ist, während bei Temperaturen unter 43 °C die Begleitfauna nicht wirkungsvoll unterdrückt wird.

Mikroorganismen	Wachstum	Koloniefarbe
<i>Cronobacter</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29544	Gut	grün-blau bis türkis/cyan
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gut	farblos/transparent - rötlich/violett
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Gut	farblos/transparent - rötlich/violett
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gehemmt	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gehemmt	-

ISO Norm 22964:2017 Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp.

Guillaume G.O., et al. (2005) Cultural Method for Detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *Journal of Food Protection*, 68:64-9.

CRONOBACTER-CHROMOGENER-AGAR

100 g

2997.1

Product Data Sheet



CRONOBACTER CHROMOGENIC AGAR

Selective medium for detection of *Cronobacter* (formerly *Enterobacter*) *sakazakii* in milk powder and powdered infant formulae

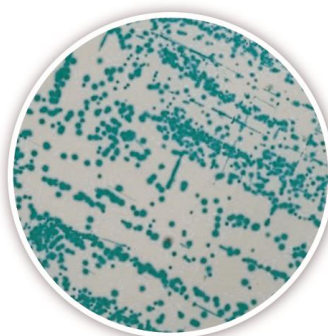
ISO 22964:2017

2997

Formulation in g/l:

Caseinpeptone (Pancreas hydrolysate)	7.0
Sodium chloride	5.0
Yeast extract	3.0
Sodium desoxycholate	0.25
Chromogene Mixture	0.15
Sodium thiosulfate	1
Ammonium iron(III) citrate	1
Agar	15.0
Final pH	7.3 ± 0.2

Store at 2-8 °C



Cronobacter
(*Enterobacter*) *sakazakii*

PREPARATION

Suspend 32.4 g of the medium in 1 l distilled water. Solubilise under heating with frequent agitation and boil for approx. 1 min until complete dissolution. Autoclave for 15 mins. at 121 °C. Let cool to 45-50 °C, homogenise gently, and pour into Petri dishes. The prepared medium is amber in colour and should be stored in the dark at approx. 10 °C.

USES

Cronobacter Chromogenic-Agar is a selective medium for the detection of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in milk powder and powdered infant formula. The ISO normative 22964 recommends this medium for the isolation of *Cronobacter* spp.

Cronobacter is a gram-negative, ubiquitous rod-bacterium which is more or less found everywhere. In healthy adults, its pathogenic relevance is marginal. It is, however, currently considered a putative pathogen in un-weaned babies, causing severe meningitis and necrotic enterocolitis with mortality rates of 40 to 80 %. Hence, it is vital to review the manufacturing process of dairy products particularly meant for infants, guaranteeing the absence of the bacterium in the final product.

After incubation in standard or enrichment broth, a loopful (approx. 10 µl) is streaked onto the surface of the Cronobacter Chromogenic Agar plate. The plate is incubated at 44 °C ± 1 °C for 24 h ± 2 h, followed by examination for the presence of presumptive *Cronobacter* by analysing pigment formation. The high incubation temperature of 44 °C efficiently inhibits gram-positive bacteria.

The chromogenic mixture contains the chromogenic substrate α-D-glucopyranosid, that is cleaved by the bacterial α-D-glucosidase, resulting in a blue to greenish colouring of the *Cronobacter* colonies (see below). Typical colonies are small to medium sized green to blue-green colonies. Other enterobacteria grow in light to reddish colonies. Non-typical colonies are colourless to reddish/violet coloured and often slightly transparent.

Presumptive *Cronobacter* colonies should be confirmed on CASO Agar (Art. No. X937), on which they present a yellow colour, including biochemical confirmation.

MICROBIOLOGICAL TEST

The following results were obtained from type cultures after incubation at a temperature of 44 °C ± 1 °C and observed after 24 ± 2 hours. Temperatures have to be reviewed quite stringently: at ≥45 °C growth of *Cronobacter* is inhibited, while at ≤43 °C growth of the accompanying bacteria are not efficiently reduced.

Microorganisms	Growth	Colony Colour
<i>Cronobacter</i> / <i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29544	Good	green-blue – turquoise/cyan
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Good	colourless/transparent – reddish/violet
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Good	colourless/transparent – reddish/violet
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibited	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibited	-

ISO normative 22964:2017 Horizontal method for detection of *Cronobacter* spp.

Guillaume G.O., et al. (2005) Cultural Method for Detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *Journal of Food Protection*, 68:64-9.

CRONOBACTER CHROMOGENIC AGAR

100 g

2997.1

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 _ 76185 Karlsruhe

Postfach 100121 _ 76231 Karlsruhe

Telefon: +49 (0) 721/5606-0 _ Telefax: +49 (0) 721/5606-149

E-Mail: info@carlroth.de _ Internet: www.carlroth.de

s.f. 02/2018