

## **BD Bifidobacterium Agar, Modified**

### **UTILIZAÇÃO PRETENDIDA**

O **BD Bifidobacterium Agar, Modified** é um meio parcialmente selectivo utilizado para o isolamento da flora de *Bifidobacterium* nas amostras de fezes humanas.

### **PRINCÍPIOS E EXPLICAÇÃO DO PROCEDIMENTO**

Método microbiológico.

As espécies *Bifidobacterium* consistem em bastonetes gram-positivos, anaeróbios, ramificados ou pleomórficos que podem ser isolados a partir de uma variedade de materiais como, por exemplo, fezes humanas e animais, esgotos e amostras provenientes da cavidade oral. O principal habitat destes organismos nos humanos é o intestino grosso onde se encontram entre os principais grupos de bactérias intestinais normais, atingindo  $10^9$  a  $10^{11}$  por grama de fezes em adultos saudáveis.<sup>1</sup> Quando a composição da flora normal é afectada por factores internos ou externos como, por exemplo, por uma terapêutica antimicrobiana ou antineoplástica, pode verificar-se um desenvolvimento excessivo por *Enterobacteriaceae*, bactérias do tipo pseudomonas ou leveduras.<sup>1-3</sup> O estado de desenvolvimento excessivo poderá ser responsável pela diarreia crónica e outras perturbações intestinais e digestivas. Uma vez que a sua patogenicidade é reduzida, as bifidobactérias e os lactobacilos são cada vez mais utilizados como probióticos para melhorar a composição da flora intestinal normal no caso de perturbações. Além disso, a utilização de probióticos tem sido debatida para melhorar determinadas perturbações ou síndromes extra-intestinais como, por exemplo, a vaginite, infecção por *Helicobacter pylori* e fibrose cística.<sup>3</sup> A administração de bifidobactérias tem sido recentemente descrita como um contributo para o aumento de peso e anomalia intestinal em bebés pré-termo.<sup>4</sup>

Foram concebidos vários meios para o isolamento electivo ou selectivo de bifidobactérias.<sup>1,2,5-9</sup> Uma vez que o género é composto por mais do que 25 espécies conhecidas com uma heterogeneidade considerável em termos de resistência a agentes antimicrobianos e a outros inibidores, é difícil desenvolver um único meio com uma selectividade boa, mantendo ao mesmo tempo uma recuperação boa. Em várias investigações, reivindica-se o facto de que o Meio de Bifidobacterium conforme descrito por Beerens<sup>1,5</sup> permite uma boa recuperação das espécies de *Bifidobacterium* presentes no tracto intestinal do homem. Estudos recentes demonstram que a maioria das estirpes são recuperadas em contagens mais elevadas em meios selectivos comparáveis para estas bactérias.<sup>1,2</sup>

O Meio de Bifidobacterium conforme descrito por Beerens baseia-se numa base de agar de Columbia, suplementado com ácido propiónico, a um pH de 5,0.<sup>5</sup> Foi demonstrado que o ácido propiónico inibe os fungos e várias bactérias que não as bifidobactérias como, por exemplo, *Bacteroides* e *Enterobacteriaceae*. O pH baixo do meio contribui ainda mais para a inibição de organismos predominantes em fezes humanas, como é o caso das espécies *Bacteroides* e *Eubacterium*. A cisteína é um agente de redução. O agar **BD Bifidobacterium Agar, Modified** trata-se numa ligeira modificação do meio original, suplementado com lactulose, um açúcar utilizado como um prebiótico que é preferencialmente fermentado pelas bifidobactérias. A glucose como um açúcar universal foi adicionada para acelerar o crescimento inicial. A riboflavina é uma vitamina para várias bifidobactérias.<sup>8</sup> O pH foi ligeiramente aumentado de 5,0 para 5,5 para reforçar a concentração de gel do agar e melhorar o desenvolvimento de *Bifidobacterium*.

## REAGENTES

### BD Bifidobacterium Agar, modified

Fórmula\* por Litro de Água Purificada

Base de agar de Columbia	42,5 g
Glucose	2,5
Lactulose	2,5
Cisteína HCl	0,5
Riboflavina	0,01
Ácido propiónico	5,0 mL

pH 5,5 ± 0,2

\*Ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios do desempenho.

## PRECAUÇÕES

**IVD** . Apenas para uso profissional. 

Não utilizar as placas que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secura, fissuras ou outros sinais de deterioração.

Consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO** para informação sobre os procedimentos de manuseamento asséptico, os riscos biológicos e os procedimentos de eliminação do produto usado.

## ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

Após recepção das placas, conservar no escuro a uma temperatura entre 2 e 8°C, dentro do invólucro original até ao momento da utilização. Evitar congelar e aquecer excessivamente. As placas podem ser inoculadas até ao prazo de validade (ver a etiqueta da embalagem) e incubadas durante o tempo de incubação recomendado.

As placas são fornecidas em pilhas de 10 e, quando uma destas pilhas é aberta, as respectivas placas terão de ser utilizadas no prazo máximo de uma semana, se forem conservadas em local limpo a uma temperatura entre 2 e 8°C.

## CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

Inocular amostras representativas com as seguintes estirpes (para mais detalhes, consultar as **INSTRUÇÕES GERAIS DE UTILIZAÇÃO**). Incubar em atmosfera anaeróbia durante 2 a 3 dias, a uma temperatura entre 35 e 37°C.

Estirpes	Resultados de crescimento
<i>Bifidobacterium longum</i> DSM 20219	Crescimento bom a excelente; colónias cremes a brancas, odor ácido
<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20082	Crescimento bom a excelente; colónias cremes a brancas, odor ácido
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Inibição (parcial a) completa
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	Inibição parcial a completa
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inibição (parcial a) completa
Não inoculadas	Âmbar claro

## PROCEDIMENTO

### Materiais fornecidos

**BD Bifidobacterium Agar, Modified** (placas **Stacker** de 90 mm). Microbiologicamente controlado.

### Materiais não fornecidos

Meios de cultura auxiliares, reagentes e equipamento laboratorial, conforme necessário.

### Tipos de amostra

Este meio é utilizado para o isolamento e determinação quantitativa de espécies de *Bifidobacterium* provenientes de amostras de fezes de amostras de doentes que sofrem de diarreia crónica e de outras perturbações intestinais e digestivas (consultar também

**CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO).** As amostras de fezes (idealmente 10 a 15 gramas de fezes) não devem ter mais do que 24 h. Recomenda-se a utilização de um meio de transporte anaeróbio.

#### **Procedimento do teste**

Antes da utilização, o **BD Bifidobacterium Agar, Modified** pode ser previamente reduzido numa atmosfera anaeróbia durante, pelo menos, 24 h, devendo ser mantido à temperatura ambiente. Este procedimento poderá aumentar as contagens viáveis dos organismos que são possíveis de detectar. O sistema anaeróbio **BD GasPak** pode ser utilizado para esse efeito. Para o estudo da flora fecal, as amostras de fezes humanas frescas deverão ser submetidas a suspensão numa solução salina estéril ou solução salina anaeróbia (solução salina contendo 0,1 g de cisteína HCl por litro), e seguidamente a dez diluições adicionais no mesmo meio de suspensão. As amostras de 20 a 50 µL das diluições mais elevadas (por exemplo,  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$ ) devem ser pipetadas no **BD Bifidobacterium Agar, Modified** que é, em seguida, inoculado por extensão e incubado em condições anaeróbias, utilizando, por exemplo, o sistema anaeróbio **BD GasPak**.

Os outros meios (por exemplo, para a determinação de contagens totais e possivelmente para a detecção de outros grupos bacterianos, por exemplo, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*) deverão também ser inoculados com base nas diluições fecais apropriadas e incubados de acordo com os requisitos dos meios e dos grupos bacterianos.

#### **Resultados e interpretação**

Após a incubação, as placas devem ser examinadas para verificar se existem indícios de crescimento. As colónias apropriadas devem ser testadas microscopicamente (colorações de Gram) quanto à presença de bastonetes típicos, gram-positivos e bífidos. Em seguida, é possível proceder à contagem das colónias e o número de colónias é depois multiplicado pelo factor de diluição da amostra para obter a CFU por grama de fezes. É necessário realizar repicagens e testes bioquímicos para a identificação final dos organismos isolados.

Na fezes de indivíduos saudáveis, as bifidobactérias deverão estar presentes em contagens elevadas enquanto nos casos em que não existem ou apresentam contagens baixas poderão ser um indício de perturbação intestinal.<sup>1-3,5,9</sup>

A ocorrência reduzida de bifidobactérias na flora normal não implica o tratamento de doentes com agentes antimicrobianos ou medicamentos que não os probióticos, excepto nos casos em foram detectados agentes infecciosos específicos como causa da perturbação.

#### **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

Este meio é utilizado para a determinação da flora de *Bifidobacterium* nas fezes do homem. A formulação de Beerens do Agar de Bifidobacterium e meios semelhantes demonstraram ser superiores aos meios com um grau de selectividade superior relativamente ao isolamento de bifidobactérias existentes no intestino do homem.<sup>1,2,5,6</sup>

Existem bifidobactérias que são extremamente exigentes e não se desenvolvem de forma suficiente neste ou noutros meios selectivos. Por essa razão, deverá ser também incluído um meio não selectivo (por exemplo, o **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood**).<sup>1,6,7</sup>

Graças ao seu pH baixo e à adição de ácido propiónico, o **BD Bifidobacterium Agar, Modified** inibe lactobacilos, espécies de *Eubacterium*, clostrídios, *Enterobacteriaceae* entre outros. A inibição pode ser parcial a completa consoante os organismos. Caso sejam inoculadas fezes humanas não diluídas, poderá verificar-se o crescimento de organismos não pertencentes à espécie *Bifidobacterium* neste meio.

O **BD Bifidobacterium Agar, Modified** não deverá ser utilizado para o isolamento da espécie *Bifidobacterium* de fezes que não sejam provenientes do homem.<sup>1</sup>

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Hartemink, R., and F.M Rombouts. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. J. Microbiol. Meth. 36: 181-192.

2. Hartemink, R. et al. 1996. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. J. Microbiol. Meth. 27: 33-43.
3. Gorbach, S.L. 2002. Probiotics in the third millenium. Dig. Liver Dis. 34 (suppl. 2):S2-S7.
4. Kitajima, H., et al. 1997. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomized controlled trial.. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Med. 76: F101-F107.
5. Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. Lett. Appl. Microbiol. 11: 155-157.
6. Dave, R.I., and N.P. Shah. 1995. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. J. Dairy Sci. 79: 1529-1536.
7. Munoa, F.J., and R. Pares. 1988. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* species. Appl. Env. Microbiol. 54: 1715-1718.
8. Nebra, Y., and A.R. Blanch. 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. Appl. Env. Microbiol. 65: 5173-5176.
9. Silvi, S. et al. 1996. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. J. Appl. Bacteriol. 81: 561-564.

## **EMBALAGEM/APRESENTAÇÃO**

### **BD Bifidobacterium Agar, Modified**

No. de cat. 254546                      Meios em placas prontos a usar, 20 placas

## **INFORMAÇÕES ADICIONAIS**

Para obter informações adicionais, contacte o representante local da 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, Stacker and GasPak are trademarks of Becton, Dickinson and Company.

© 2012 BD