BD LBS Agar (Lactobacillus Selection Agar)

USO PREVISTO
BD LBS Agar (o agar Rogosa) è un terreno semi-definito, parzialmente selettivo, per l'isolamento e la conta di lattobacilli dalla flora intestinale, vaginale e dentale, in particolare per il rilevamento di disturbi della flora normale.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA
Metodo microbiologico.
I lattobacilli sono tra gli organismi predominanti nella flora intestinale e vaginale. Se la composizione della flora normale viene alterata da fattori interni o esterni, come la terapia antibiotica o antineoplastica, si può osservare una crescita eccessiva di *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* o lieviti.[1] La crescita eccessiva nel tratto intestinale può causare diarrea cronica e altri disturbi intestinali o digestivi. La riduzione della flora di *Lactobacillus* è stata associata a vaginiti o vaginosi nelle donne in premenopausa.[2-4] Avendo scarsa patogenicità, i *Lactobacillus* e i *Bifidobacterium* sono sempre più spesso usati come probiotici per integrare la composizione della flora normale in caso di diarrea acuta e cronica o vaginite.[5,6]
L'agar LBS è un terreno selettivo allestito da Rogosa et al. per l'isolamento e la conta di lattobacilli orali e fecali.[7,8] L'agar LBS è risultato più selettivo nel prevenire la crescita eccessiva di muffe, streptococchi e organismi diffusi rispetto all'agar succo di pomodoro utilizzato in precedenza. **BD Rogosa Agar** viene utilizzato per l'isolamento e la conta di lattobacilli da alimenti, prodotti caseari e flora umana intestinale, vaginale e dentale.[9,10]
Nel **BD LBS Agar**, peptone di caseina, estratto di lievito e sale di ammonio forniscono l'azoto. Polisorbato 80 fornisce gli acidi grassi necessari per la crescita dei lattobacilli. Manganese e magnesio sono fattori di crescita e il glucosio è una fonte generica di energia e carbonio. Citrato di ammonio, acetato di sodio, acido acetico e solfato di ferro inibiscono streptococchi e altri organismi contaminanti e mantengono il pH basso, che viene tollerato dai lattobacilli ma non da numerosi altri organismi. Per stabilizzare il pH si usa fosfato con acetato e acido acetico.

REAGENTI
BD LBS Agar (Lactobacillus Selection Agar)
Formula per litro di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	10,0 g	Acetato di sodio idrato	25,0 g
Estratto di lievito	5,0	Acido acetico	1,3 mL
Fosfato di idrogeno dipotassico	6,0	Solfato di magnesio	0,575 g
Citrato di ammonio	2,0	Solfato di manganese	0,12
Glucosio	20,0	Solfato di ferro	0,034
Polisorbato 80	1,0	Agar	15,0

pH 5,5 ± 0,2
*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

PRECAUZIONI
IVD . Solo per uso professionale.
Non usare le piastre se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni cromatiche, essiccamento, fissurazioni o altri segni di deterioramento.
Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE
Alla consegna, conservare le piastre al buio a 2 – 8 °C nella confezione originaria fino a immediatamente prima dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le piastre possono

essere inoculate sino alla data di scadenza (v. l'etichetta sulla confezione) e incubate per i tempi di incubazione raccomandati.
Le piastre prelevate dalle confezioni da 10 già aperte possono essere usate per una settimana se conservate in luogo pulito a 2 – 8 °C.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Inoculare i campioni rappresentativi con i seguenti ceppi (per informazioni più dettagliate, v. **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**). Incubare le piastre a 35 – 37 °C in atmosfera anaerobica per 2 – 3 giorni.

Ceppi	Risultati della crescita
Lactobacillus acidophilus ATCC 4356	Crescita da buona a eccellente
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	Crescita da buona a eccellente
Proteus mirabilis ATCC 43071	Inibizione completa
Escherichia coli ATCC 25922	Inibizione completa
Non inoculate	Chiare, da color ambra chiaro ad ambra

PROCEDURA

Materiali forniti

BD LBS Agar (piastre impilate **Stacker** da 90 mm). Microbiologicamente controllate.

Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Tipi di campioni

Il terreno viene usato per rivelare la presenza di *Lactobacillus* sia nei pazienti con diarrea cronica e altre patologie intestinali e digestive [usare campioni di feci (possibilmente 10 – 15 grammi) che abbiano meno di 24 ore], sia nella flora vaginale e dentale (usare tamponi vaginali o dentali). Vedere anche **CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**. Il terreno viene usato anche per rivelare la presenza di lattobacilli negli alimenti. Si consiglia di usare un terreno di trasporto anaerobico per ogni tipo di campione o prelievo.

Procedura del test

Per analizzare la flora intestinale, sospendere campioni freschi di feci umane in soluzione fisiologica sterile o anaerobica (contenente 0,1 g di cisteina-HCl per litro), diluendo dieci volte nello stesso mezzo di sospensione. Pipettare 20 – 50 µL ad alta diluizione (10^{-4} – 10^{-7}) su **BD LBS Agar**, che viene inoculato per strisciamento superficiale e incubato in aerobiosi, ad es. usando il sistema anaerobico **BD GasPak**.
Per i campioni alimentari si può usare la stessa procedura.
Se il materiale viene posto in coltura direttamente da un tampone, passare il tampone su una piccola area del bordo e strisciare dalla zona inoculata per isolare le colonie.
Inoculare e incubare anche altri terreni (per la conta totale ed eventualmente l'individuazione di altri gruppi batterici, ad es. *Bacteroides, Clostridium, Enterobacteriaceae*), tenendo conto dei requisiti previsti per i terreni e i batteri.

La temperatura e il tempo di incubazione ottimali sono 35 – 37 °C per 2 – 3 giorni. Se è necessario ricavare subcolture dagli isolati, non protrarre ulteriormente il periodo di incubazione in quanto la vitalità delle colonie potrebbe risentirne.

Risultati e interpretazione

Su **BD LBS Agar**, i lattobacilli appaiono come colonie bianche medio-grandi. Se l'inoculazione su piastra dei campioni è stata valutata quantitativamente, è possibile contare le colonie e moltiplicarne il numero per il fattore di diluizione del campione, ottenendo il valore di UFC per grammo di campione o materiale. Per differenziare ulteriormente la crescita eseguire test microscopici e biochimici.
I lattobacilli sono presenti in gran numero nelle feci o nei campioni vaginali dei soggetti sani, mentre se sono assenti o ridotti possono indicare, rispettivamente, disturbi intestinali o vaginiti.[1,2,4] Un numero ridotto di lattobacilli nella flora normale non implica che i pazienti

debbano essere trattati con agenti antimicrobici o farmaci diversi dai probiotici, salvo il caso in cui la diarrea o la vaginite siano causate da specifici agenti infettivi.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

BD LBS Agar è un terreno abitualmente impiegato per l'isolamento di *lactobacillus* dalla flora umana e dagli alimenti.[1,7-10]
La presenza e il numero di lattobacilli nella flora vaginale dipendono dall'età: si può prevedere una conta elevata solo nelle donne sane in premenopausa.[2]
Non usare **BD LBS Agar** come terreno di mantenimento per lattobacilli.
Il terreno non è in grado di inibire completamente streptococchi, enterococchi e lattococchi. Per differenziare facilmente i lattobacilli da questi cocchi Gram-positivi, si possono utilizzare sia indagini microscopiche che la colorazione di Gram.
A causa dell'elevata concentrazione salina, il terreno è inadatto all'isolamento di *Lactobacillus lactis* e *L. bulgaricus*, che in genere vengono isolati dai prodotti caseari.[9]

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. Spiegel, C.A. 1991. Bacterial vaginosis. Clin. Microbiol. Rev. 4: 485-502.
3. Hammann, R., Lang, N., and H. Werner. 1984. Die Rolle von *Gardnerella vaginalis* und Anaerobiern – Ätiologie der unspezifischen Kolpitis. Fortschr. Med. 102: 255-258.
4. Hammann, R., A. Kronibus, N. Lang, and H. Werner. 1987. Quantitative studies on the vaginal flora of asymptomatic women and patients with vaginitis and vaginosis. Zbl. Bakt. A 265: 451-461.
5. Pant, A.R., et al. 1996. *Lactobacillus* GG and acute diarrhea in young children in the tropics. J. Trop. Pediatr. 42: 162-165.
6. Parent, D., et al. 1996. Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied *Lactobacilli acidophili* and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial. Arzneimittelforschung 46: 68-73.
7. Rogosa, M. et al. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. J. Bacteriol. 62: 132.
8. Rogosa, M. et al. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. J. Dental Res. 30: 682.
9. Downes, F.P., and K. Ito (eds.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.
10. MacFaddin, J. D. 1985. Media for isolation-cultivation-identification- maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 275-284. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD LBS Agar

N. di cat. 255011	Terreni su piastra pronti all'uso, confezioni da 20

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.

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.
© 2013 BD