

## BD BBL Enterotube II

### USO PREVISTO

**BBL Enterotube II** è un sistema pronto per l'uso per l'identificazione di *Enterobacteriaceae* e numerosi altri bacilli gram-negativi ossidasi-negativi.

### PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

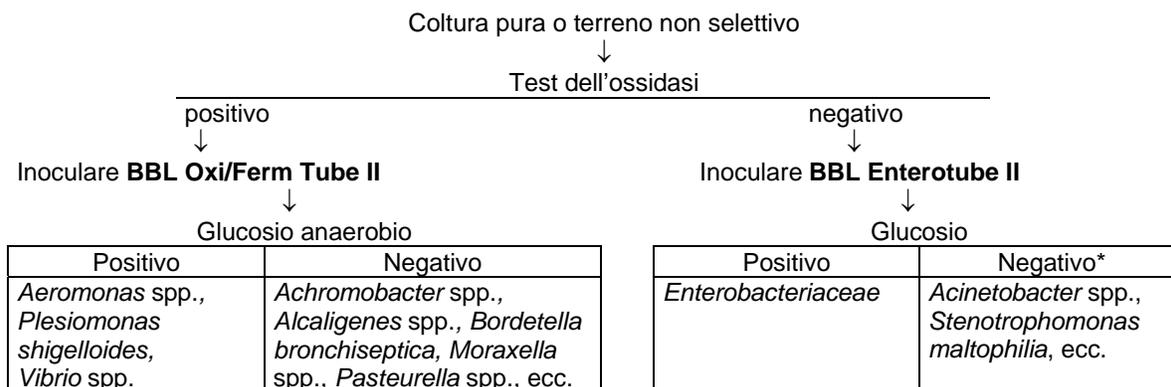
Le enterobatteriacee svolgono un ruolo primario come agenti infettivi. Questo gruppo di batteri utilizza i carboidrati principalmente per fermentazione e per ossidazione. Sono catalasi-positivi e quasi tutti ossidasi-negativi [recentemente, è stato proposto di includere *Plesiomonas shigelloides* nelle enterobatteriacee in base al sequenziamento rRNA 16S e poiché contiene l'antigene enterobatterico comune.<sup>1,2</sup> In precedenza, questo microrganismo ossidasi-positivo era incluso nella famiglia delle vibronacee]. L'identificazione delle enterobatteriacee si basa sulle reazioni biochimiche descritte da Ewing e Farmer. Per dettagli, consultare la documentazione appropriata.<sup>1-11</sup>

Mentre un'enorme gamma di generi e specie è stata descritta nel corso degli anni, i microrganismi isolati da campioni clinici appartengono a 20 – 25 specie ben conosciute da molti anni.<sup>1</sup>

**BBL Enterotube II** è una provetta autonoma in plastica, suddivisa in comparti, contenente dodici terreni diversi che consentono la determinazione di 15 reazioni biochimiche (glucosio, produzione di gas dal glucosio, lisina decarbossilasi, ornitina decarbossilasi, acido solfidrico (H<sub>2</sub>S), indolo, adonitolo, lattosio, arabinosio, sorbitolo, Voges-Proskauer (VP), dulcitol, fenilalanina deaminasi (PA), urea e citrato). Il filo di inoculo allegato consente l'inoculo di tutti i comparti in una sola fase da una o alcune singole colonie di un isolato. La conseguente combinazione di reazioni, unitamente alla Guida all'interpretazione (manuale dei codici), consente l'identificazione di enterobatteriacee clinicamente significative.

La Guida all'interpretazione (manuale dei codici) per **BBL Enterotube II** è stata elaborata usando i dati percentuali contenuti nella documentazione di riferimento per i test biochimici eseguiti con **BBL Enterotube II**.<sup>3-11</sup> Il blocchetto per la registrazione dei risultati e la tavola sinottica dei colori delle reazioni consentono un rapido controllo delle reazioni positive ottenute con **BBL Enterotube II**. Viene calcolato il totale dei numeri positivi e il numero composto viene quindi inserito nella Guida all'interpretazione per identificare i microrganismi. Laddove sono elencati due o più microrganismi, vengono forniti anche i test di conferma necessari per un'ulteriore identificazione.

Il seguente diagramma di flusso mostra come usare il test dell'ossidasi per differenziare i membri della famiglia delle enterobatteriacee dai microrganismi non fermentanti, ossidasi positivi o negativi e dai batteri gram-negativi fermentanti, ossidasi-positivi e quando usare **BBL Enterotube II** o **BBL Oxi/Ferm Tube II**.



\* Queste specie possono essere identificate con il sistema **BBL Enterotube II**, sebbene per la conferma potrebbe essere necessario usare **BBL Oxi/Ferm Tube II**.

### REAGENTI

#### **BBL Enterotube II**

Substrati, altri ingredienti attivi e colorazione dei terreni non inoculati:

- Terreno 1 (glucosio) - glucosio (20,0 g/L) contenuto in un terreno base appropriato, con rosso cresolo come indicatore di pH. Il terreno è coperto di cera per fornire condizioni di anaerobiosi e consentire la rilevazione della formazione di gas. Non inoculato: rosso.
- Terreno 2 (lisina) - lisina (10,0 g/L) contenuta in un terreno base appropriato, con porpora di bromocresolo come indicatore di pH. Il terreno è coperto di cera per fornire condizioni di anaerobiosi. Non inoculato: giallo.
- Terreno 3 (ornitina) - ornitina (10,0 g/L) contenuta in un terreno base appropriato, con porpora di bromocresolo come indicatore di pH. Il terreno è coperto di cera per fornire condizioni di anaerobiosi. Non inoculato: giallo.
- Terreno 4 (H<sub>2</sub>S/indolo) - tiosolfato di sodio (4,7 g/L), citrato ferrico di ammonio (0,6 g/L) e triptofano (1,2 g/L) in un terreno base appropriato. Non inoculato: da beige ad ambra chiaro.
- Terreno 5 (adonitolo) - adonitolo (20,0 g/L) contenuto in un terreno base appropriato, con rosso cresolo come indicatore di pH. Non inoculato: rosso.
- Terreno 6 (lattosio) - lattosio (20,0 g/L) contenuto in un terreno base appropriato, con rosso cresolo come indicatore di pH. Non inoculato: rosso.
- Terreno 7 (arabinosio) - arabinosio (20,0 g/L) contenuto in un terreno base appropriato, con rosso cresolo come indicatore di pH. Non inoculato: rosso.
- Terreno 8 (sorbitolo) - sorbitolo (20,0 g/L) contenuto in un terreno base appropriato, con rosso cresolo come indicatore di pH. Non inoculato: rosso.
- Terreno 9 (Voges-Proskauer) - glucosio (20,0 g/L) contenuto in un terreno base appropriato. Non inoculato: da incolore ad ambra chiaro.
- Terreno 10 (dulcitol/PA) - dulcitol (20,0 g/L), fenilalanina (7,0 g/L) e citrato ferrico di ammonio (0,5 g/L) contenuti in un terreno base appropriato, con blu di bromotimolo come indicatore di pH. Non inoculato: verde.
- Terreno 11 (urea) - urea (20,0 g/L) contenuta in un terreno base appropriato, con rosso fenolo come indicatore di pH. Non inoculato: da beige ad ambra chiaro.
- Terreno 12 (citrato) - citrato di sodio (2,0 g/L) contenuto in un terreno base appropriato, con blu di bromotimolo come indicatore di pH. Non inoculato: verde.

## PRECAUZIONI

**IVD**. Esclusivamente per uso professionale.

Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, distacco della cera dai rispettivi terreni, essiccamento, fessurazioni o altri segni di deterioramento.

Ciascuna delle condizioni seguenti può interferire con l'accuratezza di **BBL Enterotube II**: disidratazione o liquefazione, sollevamento della cera dalle superfici dei terreni, variazioni dei colori dei terreni rispetto a quelli indicati alla voce "Non inoculato" nella sezione **REAGENTI** ed eventuali indicazioni di crescita sulle superfici dei terreni.

Le precauzioni seguenti si riferiscono ai singoli comparti indicati.

- **Glucosio**: la copertura di cera in questo comparto produce il grado di anaerobiosi necessaria per consentire soltanto le vere caratteristiche delle reazioni di fermentazione di tutte le enterobatteriacee. Se questo terreno rimane rosso dopo l'inoculo e l'incubazione, il ceppo non appartiene alle enterobatteriacee. Le specie di *Acinetobacter* ossidasi-negative sono esempi di ceppi non-enterobatteriacee che non fermentano il glucosio in anaerobiosi in **BBL Enterotube II**. Sebbene questi microrganismi possano essere differenziati dalle enterobatteriacee usando **BBL Enterotube II** (nella Guida all'interpretazione, usare il database per i microrganismi non fermentanti ossidasi-negativi), **BBL Oxi/Ferm Tube II** potrebbe essere necessario per una loro ulteriore identificazione.
- **Fenilalanina (PA)**: il terreno può assumere una tonalità di verde più intensa dopo l'incubazione, che deve essere considerata negativa.

**Avvertenza** - Durante la preparazione e la manipolazione dei reagenti indolo e VP, rispettare procedure di manipolazione appropriate e le avvertenze di Rischio e Sicurezza.

Per le procedure di manipolazione in asepsi, i rischi biologici e lo smaltimento dei prodotti usati, consultare il documento **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

## CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Al ricevimento, conservare i prodotti **BBL Enterotube II** al buio a 2 – 8 °C nella scatola originaria sino al momento dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le provette possono essere inoculate fino alla data di scadenza e incubate per i tempi di incubazione raccomandati. Le provette prelevate da confezioni aperte possono essere usate fino alla data di scadenza. Una volta aperte, usare immediatamente le provette.

## CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Inoculare **BBL Enterotube II** con i ceppi sottoelencati. Per l'inoculo, l'incubazione e la lettura, procedere come descritto in **Procedura del test**.

MICROORGANISMI	Glucosio	Gas	Lisina	Ornitina	H <sub>2</sub> S	Indolo	Adonitol	Lattosio	Arabinosio	Sorbitolo	VP	Dulcitolio	Fenilalanina	Urea	Citrato	Biocodici accettabili
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	66007 / 66006 / 46007
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	+/(+)	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	63007 / 43007
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC 9886	+	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-/+	61404 / 41405 / 41404 / 61405
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	+	74461 / 54461 / 74061 / 54061
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+/-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	75340 / 55340
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	+	+/-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-/+	+	50771 / 70771 / 70773 / 50773
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-/(+)	+	*

\* *P. aeruginosa* è ossidasi-positivo e pertanto non incluso nei dati **BBL Enterotube II**. Questo ceppo è tuttavia utile come microrganismo di controllo per rilevare reazioni negative nei comparti gas e glucosio. += positiva; - = negativa; (+) debolmente positiva; +/- = positiva o (raramente) negativa; +/(+) = positiva o (raramente) debolmente positiva; -/+ = negativa o (raramente) positiva.

## PROCEDURA

### Materiali forniti

**BBL Enterotube II**. Microbiologicamente controllato.

Tavola sinottica dei colori delle reazioni e blocchetto per la registrazione dei risultati per **BBL Enterotube II**.

### Materiali non forniti

**BBL Enterotube II** Interpretation Guide (Guida all'interpretazione di **BBL Enterotube II**) (manuale dei codici), n. documento CM-273176.CE, suddivisa in tre database: (1) microrganismi ossidasi-negativi non fermentanti, (2) *Enterobacteriaceae* – metodica senza VP ed (3) *Enterobacteriaceae* – metodica con VP. Reagente indolo di Kovacs (Indole Dropper Reagent, 50 fiale, n. di cat. 261185) e reagenti Voges-Proskauer (Voges-Proskauer A Dropper Reagent, 50 fiale, n. di cat. 261192; Voges-Proskauer B Dropper Reagent, n. di cat. 261193); i reagenti possono essere acquistati da BD.

Materiali e reagenti per eseguire i test supplementari citati nella Guida all'interpretazione di **BBL Enterotube II**.

Sistema di identificazione **BBL Oxi/Ferm II** (n. di cat. 212116) per l'identificazione di microrganismi non-enterobatteriacee.

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

Il reagente di Kovac può essere preparato in laboratorio nel modo seguente.

Alcol amilico o isoamilico	75 mL
p-dimetilaminobenzaldeide	5 g
Acido cloridrico, concentrato	25 mL

Dissolvere la p-dimetilaminobenzaldeide (il reagente deve essere di colore giallo chiaro) in alcol e quindi aggiungere lentamente l'acido. Il reagente preparato deve avere un colore giallo paglierino ed essere conservato in un flacone marrone, refrigerato, ai fini della massima stabilità. Non usare reagenti di colore marrone scuro.

I reagenti Voges-Proskauer possono essere preparati nel modo seguente.

Soluzione di alfa-naftolo al 5%

alfa-Naftolo	5 g
Etanolo (alcol etilico), assoluto	100 mL

Soluzione di idrossido di potassio al 20%

Acqua	100 mL
Idrossido di potassio (pellet)	20 g
Creatina	300 mg

Dopo la preparazione, i reagenti Voges-Proskauer sono stabili in flaconi accuratamente sigillati per due settimane a 2 – 8 °C al buio.

### Tipi di campioni

**BBL Enterotube II** è un sistema di identificazione biochimica e **non** deve essere usato direttamente con campioni clinici. Usare isolati da terreni appropriati (vedere **Procedura del test**). **BBL Enterotube II** può essere usato per identificare bacilli gram-negativi aerobi, anaerobi facoltativi (*Enterobacteriaceae*) isolati da qualsiasi campione.

### Procedura del test

Per l'inoculo di **BBL Enterotube II**, è possibile usare la crescita da agar MacConkey (MAC), Eosin Methylene Blue (EMB), Salmonella Shigella (SS) o Hektoen Enteric (HE) oppure da terreni agar sangue non selettivi. La coltura usata per l'inoculo deve avere almeno 18 ore, ma di norma non più di 48. Accertarsi che l'isolato da identificare con **BBL Enterotube II** sia una coltura pura di un bacillo gram-negativo. **BBL Enterotube II** deve essere usato soltanto su isolati ossidasi-negativi in quanto l'identificazione di microrganismi ossidasi-positivi (non *Enterobacteriaceae*) richiede l'uso di **BBL Oxi/Ferm Tube II**.

1. Preparare un foglio dal blocchetto dei codici per l'isolato inserendo il nome del paziente, il numero del campione e la data.  
Nota - L'utente può decidere se usare i database con o senza VP. A seconda di quanto deciso, usare il fronte o il retro del blocchetto dei codici. In caso di scelta del database senza VP, può essere necessario eseguire la reazione VP come test supplementare per i microrganismi selezionati.
2. Prendere una provetta **BBL Enterotube II** e riportare sull'etichetta il nome del paziente, il numero del campione e la data.
3. Rimuovere entrambi i tappi. La punta del filo di inoculo è sotto il tappo bianco. Non bruciare il filo.
4. Prelevare una colonia ben isolata direttamente con la punta del filo di inoculo **BBL Enterotube II** (**Figura 1**). In corrispondenza della punta e sul lato del filo vi dovrebbe essere una quantità visibile di inoculo. Evitare di toccare l'agar con il filo. Inoculare una o più **BBL Enterotube II** con prelievi di altre colonie come suggerito dall'esperienza.
5. Inoculare **BBL Enterotube II** torcendo prima il filo e quindi retraendolo attraverso tutti e dodici i compartimenti, compiendo un movimento circolare (**Figura 2**).
6. Reinserire il filo (senza sterilizzare) in **BBL Enterotube II**, compiendo un movimento circolare in tutti e 12 i compartimenti, finché la tacca sul filo non è allineata all'apertura della provetta (**Figura 3**). La punta del filo deve essere visibile nel compartimento del citrato. Rompere il filo piegandolo in corrispondenza della tacca. La parte di filo rimanente nella provetta mantiene l'anaerobiosi necessaria per la reale fermentazione del glucosio, la produzione di gas e la decarbossilazione della lisina e dell'ornitina.
7. Con la parte di filo rotta, fare dei fori nel foglio che copre le prese d'aria degli ultimi otto compartimenti (adonitolo, lattosio, arabinosio, sorbitolo, Voges-Proskauer, dulcitol/PA, urea e citrato) allo scopo di supportare la crescita aerobica in tali compartimenti (**Figura 4**). Richiudere con entrambi i tappi.
8. Incubare a 35 o 37 °C per 18 – 24 h con **BBL Enterotube II** posizionata sulla sua superficie piana o verticalmente. Fare in modo che circoli l'aria tra le provette incubate.
9. Interpretare e annotare tutte le reazioni, a eccezione di indolo e Voges-Proskauer (Per istruzioni complete sulle modalità di lettura dei risultati di **BBL Enterotube II**, vedere la sezione **Risultati**.)  
Leggere tutti gli altri test prima di eseguire i test dell'indolo e di Voges-Proskauer in quanto i reagenti aggiunti per questi due test possono alterare le restanti reazioni **BBL Enterotube II**.

### Aggiunta dei reagenti indolo e Voges-Proskauer

1. Porre **BBL Enterotube II** orizzontalmente sul banco da lavoro oppure verticalmente in un portaprovette, con il compartimento del glucosio rivolto verso il basso. Nel film plastico sopra i compartimenti Indolo/H<sub>2</sub>S e VP, praticare un foro del diametro di circa 3-4 mm, perforando il film con un ago o l'estremità spezzata di un filo di inoculo **BBL Enterotube II** oppure sciogliendolo con un filo da inoculo riscaldato.

**2. Esecuzione del test dell'indolo:** Dispensare 3-4 gocce di reagente di Kovacs (n. di cat. 261185 o preparato in laboratorio; vedere la sezione **Materiali non forniti**) nel comparto H<sub>2</sub>S/indolo e dispensare quindi il reagente nel comparto. Attendere che il reagente venga a contatto con la superficie del terreno. Lo sviluppo, entro 10 sec, di una colorazione rossa distinta nel reagente dispensato indica un test positivo.

**3. Esecuzione del test Voges-Proskauer** – Questo test è obbligatorio in caso di scelta del database con VP; è possibile che lo si debba eseguire anche – come test di conferma – quanto si usa un database senza VP.

In caso di utilizzo di reagenti preparati in laboratorio (vedere la sezione **Materiali non forniti**), dispensare due gocce di soluzione di idrossido di potassio al 20%, contenente creatina allo 0,3% e tre gocce di alfa-naftolo al 5% in alcol etilico assoluto. Lo sviluppo di una colorazione rossa entro 20 min, indica un test positivo. Leggere i risultati entro 20 min!

In caso di utilizzo di Dropper Reagent, dispensare 3–5 gocce di reagente Voges-Proskauer A (n. di cat. 261192) e 1–2 gocce di reagente Voges-Proskauer B (n. di cat. 261193). Lo sviluppo di un colore rosso ciliegia entro 5–15 min indica una reazione positiva. La comparsa di una colorazione ramata - marroncina è invece indice di risultato negativo. Leggere i risultati entro 15 min!

## Risultati

Per identificare l'isolato, seguire le istruzioni fornite di seguito. Le informazioni sull'aspetto delle reazioni positive e negative sono fornite nella Tabella 1.

**Nota** - Se nel comparto del glucosio non si verifica alcuna variazione cromatica o si sviluppa un color arancio e negli altri comparti si riscontra una crescita evidenziata da variazioni cromatiche, l'organismo non fa parte della famiglia delle enterobatteriacee. (Vedere la sezione **PRECAUZIONI**.)

1. Dopo 18 – 24 h di incubazione, interpretare tutte le reazioni. Leggere le reazioni (a eccezione di indolo e VP) in ordine sequenziale comparando i colori dei terreni nella provetta dopo l'incubazione ai colori riportati nell'apposita tavola sulla copertina del blocchetto dei codici ed (eventualmente) a una provetta **BBL Enterotube II** non inoculata (una volta che essa sia portata a temperatura ambiente) (**Figura 5**). Tutte le reazioni che devono essere positive, possono presentare un'intensità uguale, superiore o inferiore rispetto ai colori indicati nella tavola sinottica dei colori delle reazioni.
2. Indicare ciascun risultato positivo facendo un cerchio interno al numero riportato sotto il comparto appropriato nel blocchetto per la registrazione dei risultati (**Figure 6**).
3. Eseguire infine i test dell'indolo e VP. Se positivi, fare un cerchio intorno ai numeri appropriati sul foglio preparato. Il test VP è obbligatorio soltanto in caso di scelta del database con VP.
4. Aggiungere i numeri cerchiati nella sezione tra parentesi e riportare la somma nello spazio appositamente fornito sotto la freccia (**Figura 6**).
5. Individuare il numero a cinque cifre nella Guida all'interpretazione (manuale dei codici) e trovare le risposte più adatte nella colonna intitolata "Valore ID". Accertarsi di usare il database destro [(1) microrganismi ossidasi-negativi, (2) *Enterobacteriaceae* – metodica senza VP ed (3) *Enterobacteriaceae* – metodica con VP]. Nell'esempio illustrato nella Figura 6, si ottiene l'identificazione di *Klebsiella pneumoniae*.

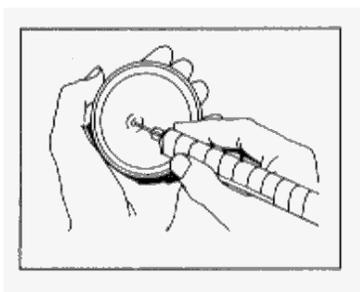


Figura 1

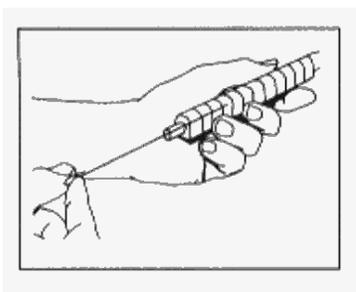


Figura 2

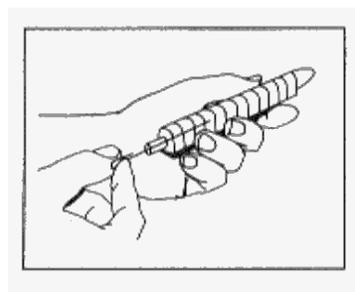


Figura 3

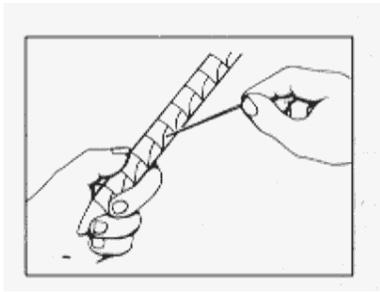


Figura 4

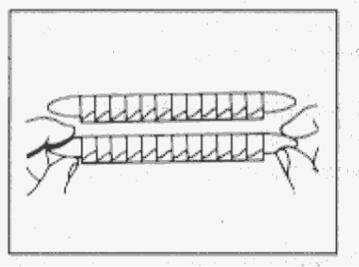
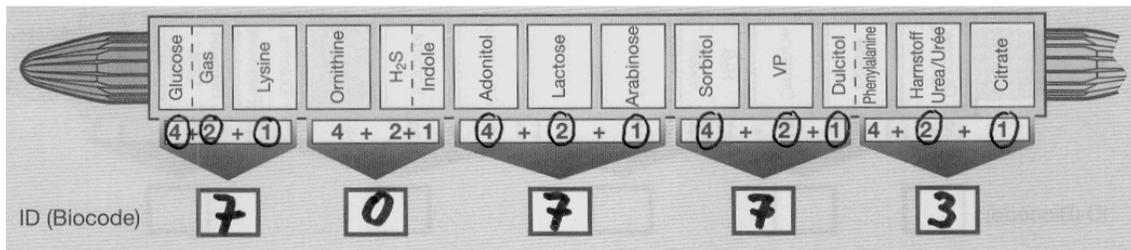
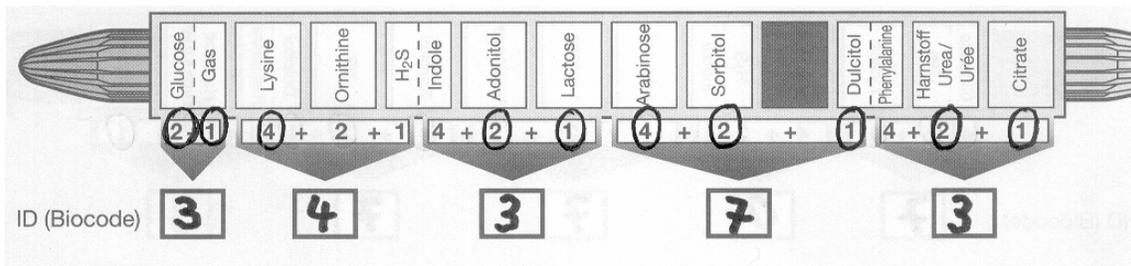


Figura 5



(A)



(B)

**Figura 6 - BBL Enterotube II** Blocchetto per la registrazione dei risultati (A = database con VP; B = database senza VP)

**Tabella 1 - Aspetto delle reazioni negative e positive in BBL Enterotube II**

REAZIONI			OSSERVAZIONI
Reagenti	Negativa	Positiva	
<b>COMPARTO 1</b>			
Glucosio	rosso (-arancio)	giallo (-oro)	<b>Glucosio (GLU):</b> i prodotti finali della fermentazione batterica del glucosio sono acido oppure acido e gas. La variazione di pH dovuta alla produzione di acido è indicata dal viraggio dal rosso (alcalino) al giallo (acido) dell'indicatore nel terreno. Qualsiasi grado di giallo deve essere interpretato come reazione positiva; l'arancio indica invece una reazione negativa.
Produzione di gas	cera non sollevata	cera sollevata	<b>Produzione di gas (GAS):</b> è evidenziata dalla separazione netta e completa della copertura di cera dalla superficie del terreno di glucosio, ma non dalle bolle nel terreno. Poiché la quantità di gas prodotta da batteri diversi varia, l'entità di separazione tra terreno e copertura varia anch'essa a seconda del ceppo testato.
<b>COMPARTO 2</b>			
Lisina	giallo	porpora	<b>Lisina decarbossilasi (LYS):</b> la decarbossilazione batterica della lisina, che determina la formazione di cadaverina, prodotto finale alcalino, è indicata dal viraggio dal giallo pallido (acido) al porpora (alcalino) dell'indicatore nel terreno. Il terreno rimane giallo se non si verifica la decarbossilazione della lisina.
<b>COMPARTO 3</b>			
Ornitina	giallo	porpora	<b>Ornitina decarbossilasi (ORN):</b> la decarbossilazione dell'ornitina, che determina la formazione di putrescina, prodotto finale alcalino, è indicata dal viraggio dal giallo pallido (acido) al porpora (alcalino) dell'indicatore nel terreno. Il terreno rimane giallo se non si verifica la decarbossilazione dell'ornitina.
<b>COMPARTO 4</b>			
H <sub>2</sub> S	beige - ambra chiaro	nero	<b>Produzione di acido solfidrico (H<sub>2</sub>S)</b> - L'acido solfidrico è prodotto da batteri in grado di ridurre i composti contenenti zolfo, come per esempio i peptoni e il tiosolfato di sodio presenti nel terreno. L'acido solfidrico reagisce con i sali di ferro anch'essi presenti nel terreno, formando un precipitato nero di solfuro ferrico, generalmente lungo la linea di inoculo. Alcuni ceppi di <i>Providencia</i> possono sviluppare una colorazione marrone diffusa in questo terreno, che non deve tuttavia essere confusa con la reale produzione di H <sub>2</sub> S indicata dalla presenza di un colore nero. <b>N.B.</b> Il precipitato nero può sbiadirsi o ritornare negativo se la lettura di <b>BBL Enterotube II</b> viene effettuata dopo 24 h di incubazione.
Formazione di indolo	incolore**	rosa-rosso	<b>Formazione di indolo (IND)</b> - La produzione di indolo dal metabolismo del triptofano da parte dell'enzima triptofanasi, è indicata dallo sviluppo di una colorazione rosa – rossa in seguito all'aggiunta del reagente indolo di Kovacs, iniettato nel comparto dopo 18–24 h di incubazione della provetta (vedere la sezione <b>Procedura del test</b> ).
<b>COMPARTI 5,6,7,8</b>			
Adonitolo, lattosio, arabinosio, sorbitolo	rosso (-arancio)	giallo (-oro)	<b>Adonitolo (ADON), lattosio (LAC), arabinosio (ARAB), sorbitolo (SORB):</b> la fermentazione batterica di adonitolo, lattosio, arabinosio e sorbitolo, che determina la formazione di prodotti finali acidi, è indicata dal viraggio dal rosso (alcalino) al giallo (acido) dell'indicatore nel terreno. Qualsiasi grado di giallo deve essere interpretato come reazione positiva; l'arancio indica invece una reazione negativa.
<b>COMPARTO 9</b>			
Voges-Proskauer	incolore – ambra chiaro	rosso	<b>Voges-Proskauer (VP)</b> - L'acetilmetilcarbinolo (acetoina) è un prodotto intermedio nella produzione di butilenglicole dalla fermentazione del glucosio. La produzione di acetoina si rileva aggiungendo i reagenti VP chimici dopo l'incubazione (vedere la sezione <b>Procedura del test</b> ). La presenza di acetoina è indicata dallo sviluppo di una colorazione rossa entro 5–20 min.
<b>COMPARTO 10</b>			
Dulcitol	verde	giallo (-oro)	<b>Dulcitol (DUL):</b> la fermentazione batterica di dulcitol, che determina la formazione di prodotti finali acidi, è indicata dal viraggio dal verde (alcalino) al giallo – giallo pallido (acido) dell'indicatore nel terreno.
PA	qualsiasi tonalità di verde	nero – grigio fumo	<b>Fenilalanina deaminasi (PA):</b> questo test rileva la formazione di acido piruvico dalla deaminazione della fenilalanina. L'acido piruvico formato reagisce con il sale ferrico presente nel terreno sviluppando un caratteristico colore nero – grigio fumo. Non è necessario aggiungere cloruro ferrico perché il terreno contiene già un sale di ferro.

COMPARTO 11			
Urea	beige - ambra chiaro	rosa chiaro - rosa	<b>Urea (UREA):</b> l'ureasi, un enzima caratteristico di vari microrganismi, idrolizza l'urea in ammoniaca determinando il viraggio dal giallo (acido) al rosso-porpora (alcalino) dell'indicatore nel terreno. Il test dell'ureasi è fortemente positivo per <i>Proteus</i> spp. e può essere evidente dopo sole 4 - 6 h di incubazione; è debolmente positivo (color rosa chiaro) dopo 18 - 24 h di incubazione per <i>Klebsiella</i> ed <i>Enterobacter</i> spp.
COMPARTO 12			
Citrato	verde	blu	<b>Citrato (CIT):</b> questo test rileva i microrganismi in grado di utilizzare il citrato, sotto forma del suo sale sodico, come unica fonte di carbonio. I microrganismi in grado di utilizzare il citrato producono metaboliti alcalini che determinano il viraggio dell'indicatore da verde (acido) a blu notte (alcalino). Qualsiasi grado di blu deve essere considerato positivo. N.B. Alcuni microrganismi non sempre producono un ideale "forte" viraggio positivo. Tonalità più leggere dello stesso colore di base devono anch'esse essere considerate positive.

## PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

**BBL Enterotube II** è un sistema concepito specificamente per l'identificazione di bacilli gram-negativi ossidasi-negativi e deve essere usato unicamente per differenziare i membri della famiglia delle enterobatteriacee. Questo sistema consente anche di identificare un numero limitato di microrganismi non fermentanti ossidasi-negativi, per i quali si raccomanda tuttavia l'uso di **BBL Oxi/Ferm Tube II**.

Per l'identificazione di altri batteri gram-negativi, sono necessari altri test biochimici.

I biocodici **BBL Enterotube II** non possono essere usati per definire l'identità fenotipica tra isolati dello stesso campione o di campioni diversi.

### Prestazioni metodologiche

**BBL Enterotube II** è stato valutato in numerosi studi esterni. I dati pubblicati indicano un'accuratezza di identificazione dell'87 - 99%.<sup>12-14</sup>

**Riproducibilità** - Tre laboratori indipendenti hanno testato dieci microrganismi in duplicato su un arco di tre giorni usando **BBL Enterotube II**. Tre (30%) microrganismi hanno evidenziato biocodici identici per ogni duplicato in ciascun laboratorio di analisi. Cinque (50%) microrganismi hanno presentato leggere variazioni nei biocodici, ma hanno sviluppato un'identificazione identica per ogni replicato. Due (20%) microrganismi hanno evidenziato leggere variazioni nei biocodici con identificazione identica per due replicati su 18 per questi microrganismi determinando biocodici non identificabili. La concordanza di identificazione per tutti i replicati è complessivamente risultata pari al 98,9%.

In uno studio, 247 ceppi precedentemente identificati (incluse colture ATCC conosciute) sono stati analizzati usando il sistema di identificazione **BBL Enterotube II**. All'inoculo iniziale, nove microrganismi hanno presentato risultati biochimici discrepanti. Al reinoculo, otto di questi risultati discrepanti sono stati risolti. In cinque casi, il risultato risolto è stato equivalente a quello iniziale della metodica di riferimento. In tre casi, il test risolto è stato equivalente al risultato iniziale **BBL Enterotube II**. In un caso, il risultato risolto è stato diverso dal risultato iniziale. Il test biochimico discrepante è stato risolto usando una terza metodica che ha prodotto un risultato simile a quello di **BBL Enterotube II**.

La Tabella 2 riassume i campioni dello studio. Viene fornito un elenco di genere, specie, numero di ceppi testati e percentuale dei microrganismi che hanno prodotto reazioni biochimiche positive.

### Limitazioni della procedura

**BBL Enterotube II** è concepito per la tassonomia fornita. Tassonomie diverse da quella elencata nella Tabella 3 non sono destinate all'uso in questo sistema.

I biocodici **BBL Enterotube II** non possono essere usati per definire l'identità fenotipica tra isolati dello stesso campione o di campioni diversi.

I risultati biochimici ottenuti con **BBL Enterotube II** possono differire da quelli di altre metodiche e dalla letteratura.

Per la conferma di *Salmonella* e *Shigella* spp., sono necessari test sierologici. Gli isolati di questi microrganismi devono essere inviati ai laboratori di riferimento appropriati per la sierotipizzazione completa e la sorveglianza epidemiologica.

L'identificazione dei batteri gram-negativi deve essere effettuata tenendo conto di altre caratteristiche quali la fonte del campione, l'anamnesi del paziente, la morfologia delle colonie e microscopica, la sierologia e i pattern di sensibilità agli antibiotici.

Per verificare l'identificazione di tali microrganismi, è necessario ripetere l'identificazione di isolati rari o eseguire altri test.

Alcuni ceppi di microrganismi possono evidenziare reazioni biochimiche atipiche dovute a mutazioni o requisiti nutrizionali insoliti ed essere difficili da identificare.

Alcuni microrganismi possono richiedere oltre 24 h di incubazione per una corretta identificazione. Nonostante la recente proposta di includere *Plesiomonas shigelloides* nella famiglia delle enterobatteriacee, questa specie non è inclusa nei database **BBL Enterotube II**.<sup>1,2</sup> Questo microrganismo deve invece essere testato usando il sistema e il database BBL Oxi/Ferm Tube II.

**Tabella 2 - Risultati della valutazione delle prestazioni**

Microrganismi	N. testato	GLU	GAS	LYS	ORN	H <sub>2</sub> S	IND	ADO	LAC	ARA	SOR	DUL	PA	URE	CIT
<b>ACINETOBACTER</b>															
<i>A. anitratus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
<i>A. Iwoffii</i> *	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>BURKHOLDERIA</b>															
<i>B. cepacia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<b>CEDECEA</b>															
<i>C. davisae</i>	1	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>C. lapagei</i> *	1	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100
<b>CITROBACTER</b>															
<i>C. amalonaticus</i>	1	100	100	0	100	0	100	0	0	100	100	0	0	100	100
<i>C. freundii</i>	4	100	100	0	0	100	0	0	50	100	100	0	0	50	50
<b>ESCHERICHIA</b>															
<i>E. coli</i>	83	100	92	100	78	0	99	0	88	99	100	1	0	0	0
<b>GRUPPI ENTERICI</b>															
Gruppo enterico 60*	2	100	100	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
<b>ENTEROBACTER</b>															
<i>E. aerogenes</i>	5	100	100	100	100	0	0	100	80	100	100	0	0	0	100
<i>E. amnigenus</i> , bio 1	2	100	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100
<i>E. cloacae</i>	10	100	100	10	90	0	0	10	100	100	100	20	0	10	80
<b>EWINGELLA</b>															
<i>E. americana</i>	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<b>HAFNIA</b>															
<i>H. alvei</i> *	3	100	100	100	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
<b>KLEBSIELLA</b>															
<i>K. oxytoca</i> *	8	100	0	100	0	0	100	100	100	100	100	38	0	100	100
<i>K. ozaenae</i>	4	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	50	0	50	100
<i>K. pneumoniae</i>	20	100	100	100	0	0	0	65	100	100	100	30	0	100	100
<b>KLUYVERA</b>															
<i>K. ascorbata</i> *	1	100	100	100	100	0	100	0	100	100	0	0	0	0	100
<b>MORGANELLA</b>															
<i>M. morgani</i>	2	100	100	0	100	0	100	0	0	0	0	0	100	100	50
<b>PROTEUS</b>															
<i>P. mirabilis</i> *	4	100	75	0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100
<b>PROVIDENCIA</b>															
<i>P. rettgeri</i> *	2	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100	100
<i>P. stuartii</i> *	1	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	100
<b>SALMONELLA</b>															
<i>Salmonella</i> spp.	41	100	100	100	98	100	0	0	0	100	100	100	0	0	100
<i>Salmonella (ariz)</i> IIIa	5	100	100	100	100	100	0	0	0	100	100	0	0	0	80
<b>SERRATIA</b>															
<i>S. liquefaciens</i>	3	100	100	100	100	0	0	0	67	100	100	0	100	100	67
<i>S. marcescens</i> *	5	100	20	100	100	80	0	0	0	0	80	0	0	0	100
<i>S. plymuthica</i>	1	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0
<b>SHIGELLA</b>															
<i>Shigella</i> sierogruppi A, B, C	10	100	0	0	0	0	20	0	0	20	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i>	17	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
<b>YERSINIA</b>															
<i>Y. enterocolitica</i>	1	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0
<i>Y. frederiksenii</i>	2	100	100	0	100	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0
<i>Y. ruckeri</i>	2	100	0	50	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0

\* Un microrganismo da questo gruppo proveniente da American Type Culture Collection.

**Tabella 3 - Tassonomia delle enterobatteriacee incluse nei database BBL Enterotube II**

<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella</i> serotype Pullorum
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Hafnia alvei</i> biogroup 1	<i>Salmonella (arizonae)</i> IIIa
<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella (diarizonae)</i> IIIb
<i>Cedecea neteri</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Cedecea species 3</i>	<i>Raoultella (Klebsiella) ornithinolytica</i> (group 47)	<i>Serratia marcescens</i> biogroup 1
<i>Cedecea species 5</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Citrobacter koseri (diversus)</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Serratia odorifera</i> biogroup 1
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Serratia odorifera</i> biogroup 2
<i>Citrobacter farmeri</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Leminorella</i> sp.	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Edwardsiella tarda</i> biogroup 1	<i>Moellerella wisconsensis</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	<i>Morganella morgani</i>	<i>Shigella</i> serogroups A, B, C
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Morganella morgani</i> biogroup 1	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i> biogroup 2	<i>Tatumella ptyseos</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Pantoea agglomerans (Enterobacter agglomerans complex)</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Proteus penneri</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
<i>Enterobacter cancerogenus (taylorae)</i>	<i>Proteus myxofaciens</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogroup 1	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogroup 2	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Yokenella regensburgeri</i>
<i>Escherichia coli</i> (AD), inactive	<i>Providencia rustigani</i>	Enteric group 58
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Salmonella species</i>	Enteric group 59
<i>Escherichia hermanii</i>	<i>Salmonella</i> serotype Typhi	Enteric group 60
<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Salmonella</i> serotype Choleraesuis	
<i>Escherichia blatae</i>	<i>Salmonella</i> serotype Paratyphi A	
<i>Ewingella americana</i>	<i>Salmonella</i> serotype Gallinarum	

## BIBLIOGRAFIA

- Farmer, J.J. III. 2003. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Abbott, S.L. 2003. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Farmer, J.J. III., et al. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 21:46-76.
- Ewing, W.H. 1973. Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
- Ewing, W.H. 1972. Biochemical characterization of Citrobacter freundii and Citrobacter diversus. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
- Ewing, W.H., and M.A. Fife. 1971. Enterobacter agglomerans and the Herbicola-Lathyrus bacteria. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
- Darland, G., and B.R. Davis. 1973. Biochemical and serological characterization of hydrogen sulfide producing variants of Escherichia coli. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
- Ewing, W.H. 1974. Isolation and identification of Salmonella and Shigella. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
- Ewing, W.H., B.R. Davis, and M.A. Fife. 1972. Biochemical characterization of Serratia liquefaciens and Serratia rubidaea. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.
- Brenner, D.J., et al. 1977. Taxonomic and nomenclature changes in Enterobacteriaceae. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control., Oct. 1977.
- Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Co., New York, N.Y.
- Holmes, B. 1989. Comparative evaluation of the Roche Cobas IDA and Enterotube II systems for identifying members of the family Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 27: 1027-1030.
- Mastroeni, P. et al. 1983. Comparison of six systems for the identification of Enterobacteriaceae. G. Bacteriol. Virol. Immunol. 76: 3-19.

14. Chiaradia, V. et al. 1983. Comparative evaluation of 3 miniaturized systems (API 20E, Enterotube II, Sensititre AP60) commonly used in clinical microbiology laboratories. Quad. Sclavo Diagn. 19: 159-175 [in Italian].

## **CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ**

### **BBL Enterotube II**

N. di cat. 273176                      25 provette

## **ULTERIORI INFORMAZIONI**

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



### **Becton Dickinson GmbH**

#### **BD Diagnostic Systems**

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

### **BD Diagnostic Systems Europe**

Becton Dickinson France SA

11 rue Aristide Bergès

38800 Le Pont de Claix/France

Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD, BD logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.

Enterotube and Oxi/Ferm are trademarks of Becton Dickinson GmbH.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2007 Becton, Dickinson and Company