



BBL OF Basal Medium
BBL OF Medium with Dextrose
L007484 • Rev. 10 • Aprile 2015



PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

I INTRODUZIONE

Il terreno **BBL OF Basal Medium** (terreno base **BBL OF**), allorché supplementato con un carboidrato appropriato, è usato per determinare le attività metaboliche ossidative e fermentative dei bacilli gram-negativi.

II PROCEDURA DEL TEST

1. Allentare i tappi a vite, far bollire il terreno in un bagnomaria a ebollizione* per circa 2 min prima dell'utilizzo. Raffreddare a temperatura ambiente.
***NOTA:** Si sconsiglia l'uso del forno a microonde.
2. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sottoelencate.
 - a. Inoculare due provette di ciascun terreno penetrando nel terreno una volta con un ago diritto, giungendo sin quasi al fondo della provetta. Come inoculo, usare colture di 18–24 h di **Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)**.
 - b. Coprire una provetta di ogni coppia con 1,0 mL di olio minerale sterile. Includere provette di controllo non inoculate (coperte e non coperte).
 - c. Incubare le provette a 35 ± 2 °C in aerobiosi.
3. Esaminare le provette dopo 18 – 24 e 42 – 48 h per verificare la crescita e le reazioni.
4. Risultati attesi

Terreno	Microrganismo	ATCC	Reazione	
			Non coperta	Coperta con olio
OF Basal Medium	<i>*Acinetobacter baumannii</i>	19606	–	–
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	–	–
	<i>*Shigella sonnei</i>	9290	–	–
OF with Dextrose	<i>*Alcaligenes faecalis</i>	19018	–	–
	<i>*Enterobacter aerogenes</i>	13048	A	A
	<i>*Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	A	–
	<i>*Shigella sonnei</i>	9290	A	A

Legenda: A = acido (giallo)

– = invariato (verde) o alcalino (blu)

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $6,8 \pm 0,1$ per il terreno OF Medium with Dextrose e $6,8 \pm 0,2$ per il terreno OF Basal Medium.
4. Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

I terreni **BBL OF** (ossidazione fermentazione) sono usati per la determinazione del metabolismo ossidativo e fermentativo dei carboidrati da parte dei bacilli gram-negativi in base alla reazione acida in sistema aperto o chiuso.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il terreno **BBL OF** è stato sviluppato da Hugh e Leifson, che hanno descritto la rilevanza tassonomica del metabolismo fermentativo dei carboidrati, rispetto all'ossidativo, da parte dei batteri gram-negativi.¹ Essi hanno dimostrato che quando un microrganismo viene inoculato in due provette di **BBL OF Basal Medium** contenenti un carboidrato e il terreno in una delle provette è coperto con petrolato fuso prima dell'incubazione, i pattern del metabolismo hanno rilevanza differenziale. I microrganismi ossidativi producono soltanto una reazione acida nella provetta aperta, con crescita assente o limitata e nessuna formazione di acido nella provetta coperta. I microrganismi fermentativi producono una reazione acida in entrambi i tipi di provette.

Le variazioni nell'agar coperto sono da attribuire alla reale fermentazione, mentre le variazioni nelle provette aperte sono dovute all'utilizzo ossidativo del carboidrato presente. Se il carboidrato non è utilizzato da alcuna metodica, non vi è produzione di acido in alcuna provetta.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il terreno contiene una concentrazione di carboidrati aggiunti elevata rispetto alla concentrazione di peptone, allo scopo di evitare l'utilizzo di quest'ultimo da parte di un microrganismo aerobio e la conseguente produzione di una reazione alcalina che neutralizzerebbe la leggera acidità prodotta da un microrganismo ossidativo.² Il fosfato dipotassico rafforza la capacità tampone del terreno. L'agar permette la determinazione della motilità e favorisce la distribuzione uniforme dell'acido eventualmente prodotto sulla superficie del terreno.³

Il destrosio è il carboidrato più importante per l'uso nel terreno OF Basal Medium; alcuni microrganismi possono tuttavia metabolizzare altri carboidrati, anche se incapaci di utilizzare il destrosio.

VII REAGENTI

OF Basal Medium

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	2,0	g
Cloruro di sodio	5,0	g
Fosfato dipotassico	0,3	g
Agar	2,5	g
Blu bromotimolo	0,03	g

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

OF Medium with Dextrose contiene i suddetti ingredienti con 10,0 g di destrosio, per litro.

Avvertenze e precauzioni: Per uso diagnostico *in vitro*.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Prima dello smaltimento, sterilizzare in autoclave le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Istruzioni per la conservazione: Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso, possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per i tempi di incubazione raccomandati.

Deterioramento del prodotto: Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Questo prodotto non è destinato all'uso diretto con campioni o colture miste. Il microrganismo da testare deve essere prima coltivato in coltura pura.

IX PROCEDURA

Materiali forniti: OF Basal Medium od OF Medium with Dextrose

Materiali necessari ma non forniti: Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test: Adottare tecniche asettiche.

Allentare i tappi a vite, far bollire il terreno in un bagnomaria a ebollizione* per circa 2 min prima dell'utilizzo. Raffreddare a temperatura ambiente.

Inoculare una coppia di provette OF con ciascun microrganismo da testare. Penetrare nelle provette circa 0,6 cm dal fondo, usando un ago da inoculo e un inoculo leggero. Coprire una provetta di ogni coppia con 1,0 mL di olio minerale sterile. Includere provette di controllo non inoculate (coperte e non coperte).

Incubare le provette per 48 h a 35 ± 2 °C in aerobiosi. Non refertare un risultato come negativo prima di 4 giorni di incubazione.

***NOTA:** Si sconsiglia l'uso del forno a microonde.

Controllo di qualità a cura dell'utente: Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

Per determinare fotometricamente il pH dei terreni in provetta, usare un singolo elettrodo di dimensioni sufficientemente ridotte da permetterne l'inserimento nelle provette. Posizionare la punta dell'elettrodo nella parte centrale della superficie di agar nel terreno semisolido.

X RISULTATI

Annotare i risultati come acido (A), alcalino o nessuna variazione (–). Annotare anche se il microrganismo è motile, in base alla comparsa di crescita a distanza dalla linea di inoculo. Vengono qui riportati i pattern di reazione tipici.^{2,3}

Reazione	Provetta con reazione	Provetta aperta	Provetta coperta
Ossidazione (O)	Aperta	Giallo (A))	Verde (–)
Fermentazione (F)			
Anaerogenica	Coperta	Giallo (A)	Giallo (A)
Aerogenica	Coperta	Giallo (A)	Giallo (A)
Né ossidazione né fermentazione (–)	Nessuna*	Blu o verde (–)	Verde (–)
Sia ossidazione sia fermentazione (O/F)	Entrambi	Giallo (A))	Giallo (A))

A = produzione acido

– = nessuna variazione o alcalina

* = Lettura di controllo carboidrato non inoculato; nessuna variazione di colore.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA⁴

La reazione acida prodotta dai microrganismi ossidativi appare inizialmente sulla superficie e si estende gradualmente in tutto il terreno. Laddove l'ossidazione è debole o lenta, si può osservare un'iniziale reazione alcalina sulla superficie della provetta aperta che persiste per alcuni giorni, ma alla fine diventa acida.

I microrganismi non saccarolitici producono una leggera alcalinità nella provetta aperta (colore blu-verde), mentre la provetta chiusa non presenta alcuna variazione di colore (verde).

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.^{2,5-7}

XII PERFORMANCE

OF Basal Medium

Prima della spedizione, vengono testate le prestazioni metodologiche di tutti i lotti di **BBL Motility Test Medium**. Campioni rappresentativi vengono inoculati direttamente penetrando due provette di terreno con colture di *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Shigella sonnei* ATCC 9290 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, cresciute da 18 – 24 h in **Trypticase Soy Agar** con sangue di montone al 5%. Una provetta per ogni microrganismo viene coperta con 1 mL di olio minerale. Le provette vengono incubate per 2 giorni - con i tappi non completamente avvitati - a 35 - 37 °C in aerobiosi. Non si verifica crescita con alcun microrganismo, con o senza olio minerale.

OF Medium with Dextrose

Kantor et al. hanno sviluppato una metodica rapida e semplificata usando un minimo di tre test e un massimo di sette test, che i laboratori possono utilizzare routinariamente per identificare batteri gram-negativi non fermentanti. Con questa metodica, sono stati complessivamente identificati 229 microrganismi gram-negativi non fermentanti e 14 ceppi di riferimento. Come test primari per suddividere i microrganismi non fermentanti, è stato impiegato il terreno OF Basal Medium with Glucose (Dextrose) insieme ai test dell'ossidasi e della motilità. OF Glucose è stato usato nella speciazione di *Acinetobacter*. Per microrganismi non motili, ossidasi-positivi, OF Glucose è stato usato per facilitare la differenziazione di *Moraxella* sp. da *Flavobacterium* sp. OF Glucose è stato usato per differenziare *Pseudomonas alcaligenes* da altri ceppi motili, ossidasi-positivi di *Pseudomonas* spp.⁸

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat. Descrizione

221326	BD BBL OF Basal Medium, confezione da 10 provette di misura K
221328	BD BBL OF Medium with Dextrose, confezione da 10 provette di misura K
221329	BD BBL OF Medium with Dextrose, cartone da 100 provette di misura K

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Hugh, R., and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 66:24-26.
2. MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Shigei, J. 1992. Test methods used in the identification of commonly isolated aerobic gram-negative bacteria. Oxidation-fermentation test, p. 1.19.50-1.19.53. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Miller, J.M., H.T. Holmes, and K. Krisher. 2003. General principles of specimen collection and handling, p. 55-66. *In* P.R. Murray, 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.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn, Jr. 1997. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
8. Kantor, L.T., S.D. Kominos, and R.B. Yee. 1975. Identification of nonfermentative gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Am. J. Med. Technol.* 41:3-9.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD