

ISTRUZIONI PER L'USO

OF HUGH LEIFSON BASE

Terreno in polvere


 OF Hugh Leifson Glucose Agar - da sinistra: *E.coli*,
P.aeruginosa, *A.faecalis*
1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno indicato per la differenziazione dei bacilli Gram-negativi isolati da campioni clinici o da altri materiali, in base al loro metabolismo dei carboidrati di tipo ossidativo o fermentativo.

2 - FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)*

Triptone	2,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Potassio fosfato bibasico	0,30 g
Blu di bromotimolo	0,03 g
Agar	2,50 g

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

O/F Hugh Leifson Base, preparato in accordo alla formula proposta da Hugh e Leifson¹, è un terreno a cui possono essere aggiunti vari carboidrati per lo studio del metabolismo di tipo ossidativo o fermentativo dei microrganismi. Il terreno è indicato per la differenziazione dei bacilli Gram-negativi isolati da campioni clinici e da altri materiali.^{2,3}

L'utilizzo dei carboidrati con produzione di acidi da parte dei batteri può avvenire secondo due processi: ossidativo o fermentativo. Nel processo fermentativo, in condizioni anaerobiche il piruvato è convertito in una varietà di acidi ad elevate concentrazioni, in funzione del tipo di fermentazione. L'utilizzo del glucosio attraverso la respirazione aerobica, ad esempio da parte dei batteri Gram negativi non fermentanti, si traduce nella formazione di piccole quantità di acidi durante la glicolisi e nel ciclo di Krebs.

L'O/F Medium Base, addizionato del carboidrato adatto, permette di distinguere tra i due processi metabolici descritti. Il terreno contiene il blu di bromotimolo come indicatore di pH: una variazione del pH del mezzo verso l'acidità, indotta dalla degradazione del carboidrato aggiunto, fa virare l'indicatore da verde a giallo.

Il permanere, dopo l'incubazione, di una colorazione verde del terreno o l'apparire di una colorazione blu, dovuta ad una trasformazione alcalina del mezzo, indicano che il test è negativo e che non vi è stata nessuna degradazione dello zucchero.

Il terreno prevede un alto contenuto dello zucchero scelto per il test ed un basso contenuto di peptoni per evitare una loro degradazione da parte dei microrganismi con metabolismo ossidativo, che porterebbe alla formazione di prodotti finali di natura alcalina che potrebbero mascherare l'acidità del mezzo.³ In questo modo sono ben evidenziati anche piccole quantità di acidi, prodotti durante il processo ossidativo.

O/F Hugh Leifson Base è un terreno semisolido; la presenza dell'agar a una concentrazione del 0,25% impedisce ai prodotti acidi formati di disperdersi verso la superficie con una conseguente loro diluizione e consente di determinare anche la motilità del ceppo in esame; il potassio fosfato bibasico è incorporato per promuovere la fermentazione dei carboidrati e per stabilizzare il pH del terreno¹; il triptone fornisce carbonio, azoto ed oligoelementi necessari alla crescita microbica; il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico del terreno. Il glucosio è il carboidrato che più frequentemente viene usato per il test OF; tuttavia vi sono dei casi in cui il microrganismo non è in grado di attaccare il glucosio, quindi è raccomandato l'uso di una batteria di zuccheri costituita da glucosio, lattosio, saccarosio, maltosio e in aggiunta mannitolo e xilosio.^{2,4,5}

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 9,8 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in provette con tappo a vite ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere una soluzione sterile del carboidrato desiderato, (concentrazione finale 1 % p/v). In alternativa ed in funzione della resistenza al calore, addizione 10 g/L del carboidrato prescelto, prima della sterilizzazione.

Per ciascun ceppo da esaminare preparare due provette e ricoprire una di esse con paraffina liquida per creare le condizioni di anaerobiosi.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, verde

Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta

verde, limpido.

pH (20-25°C)

7,1 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
O/F Hugh Leifson Base CND: W0104010101;EDMA:14.01.01.01; RDM: 1874640/R	Terreno di coltura in polvere	4018362	500 g (51 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse ed aghi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori. Carboidrati e paraffina.



**8 - CAMPIONI**

Il campione è costituito da colture di batteri isolati da campioni clinici o altri materiali, purificate ad esempio su Tryptic Soy Agar o agar sangue.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Con un ago da batteriologia, caricato con la colonia in esame, inoculare in duplicato il terreno in provetta, per infissione fino a circa 3/4 della sua altezza. Coprire una provetta di ciascuna coppia con uno strato di paraffina liquida di 3 cm per creare condizioni di anaerobiosi, lasciando l'altra provetta aperta.

Impostare anche set di controllo: un set inoculato senza aggiunta di carboidrati e un set non inoculato con carboidrati.

Incubare, con i tappi allentati, a 35-37°C per 44-48 ore; i ceppi a crescita lenta richiedono incubazioni più prolungate (3-4 giorni o fino a 14 giorni)³.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, esaminare le provette giornalmente per il viraggio del colore del terreno e la produzione di gas.

Ossidazione: viraggio al giallo della provetta in aerobiosi, nessun viraggio della provetta in anaerobiosi (colore del terreno verde o blu).

Fermentazione: viraggio al giallo di entrambe le provette, con produzione di gas (ceppo aerogenico) o senza (ceppo anaerogenico).

Nessuna degradazione dello zucchero (ceppo asaccarolitico): nessun viraggio al giallo di entrambe le provette che rimangono verdi (provetta chiusa) o virano al verde-blu (provetta aperta).

Nella tabella che segue, adattata da MacFaddin³, sono riassunte i modelli reattivi su O/F Hugh Leifson Base addizionato di glucosio.

Reazione	Tipo di provetta reattiva	Reazione nella provetta aperta	Reazione nella provetta chiusa
Ossidazione <i>Es. P.aeruginosa</i>	Aperta	Giallo (A)	Verde (-)
Fermentazione			
Anaerogenica <i>Es. S.dysenteriae</i>	Chiusa	Giallo (A)	Giallo (A)
Aerogenica <i>Es. E.coli</i>	Chiusa	Giallo e gas (AG)	Giallo e gas (AG)
Né fermentazione né ossidazione <i>Es. A. faecalis</i>	Nessuna*	Blu o verde (-)	Verde (-)
Fermentazione e ossidazione <i>Es. Citrobacter</i>	Entrambe	Giallo (A o AG)	Giallo (A o AG)

A: produzione di acidi; G: produzione di gas; * comparare con le provette non inoculate

Con il terreno O/F Hugh Leifson si può determinare anche la mobilità batterica (crescita diffusa a partire dalla linea dell'inoculo).

11 - CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t	RISULTATI ATTESI	
		PROVETTA APERTA	PROVETTA CHIUSA
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 14207	35-37°C – 44-48 h	terreno giallo	terreno verde
<i>A.faecalis</i> NCTC 655	35-37°C – 44-48 h	terreno verde/blu	terreno verde
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-37°C – 44-48 h	terreno giallo	terreno giallo

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection; NCTC: National Type Culture Collection of the UK Health Protection Agency

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere OF Hugh Leifson Base, addizionato di glucosio, sono testati per le caratteristiche prestazionali specifiche, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento. Coppie del terreno in provetta vengono inoculate per infissione, con colture di 18-24 ore in Tryptic Soy Agar di *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Alkaligenes faecalis* NCTC 655, *E.coli* ATCC 25922, *S.flexneri* ATCC 12022. Le provette vengono incubate con i tappi allentati a 35-37°C per 44-48 ore in atmosfera aerobica. Si osservano e si registrano i cambiamenti di colore del terreno in provetta: le reazioni batteriche ossidative/fermentative risultano conformi alle specifiche.

13 - LIMITI DEL METODO

- Non è consigliato l'uso dell'olio minerale per coprire le provette poiché consente la diffusione dell'ossigeno nel terreno.³
- Alcuni microrganismi non sono in grado di crescere su OF Hugh Leifson Medium; in questi casi si consiglia di aggiungere al terreno siero 2% o estratto di lievito 0,1%.⁴
- I ceppi asaccarolitici (né fermentanti né ossidanti) mostrano un viraggio al verde-blu nella provetta aperta e nessun viraggio del colore che rimane verde, nella provetta chiusa.³
- Alcuni batteri producono una reazione atipica: acida nel tubo chiuso ma non nel tubo aperto; *Chromobacterium violaceum* sviluppa tali reazioni atipiche con amido e maltosio.⁶





- Alcuni microrganismi richiedono tempi di incubazione prolungati per manifestare il viraggio del colore. Secondo Lederberg⁷ ciò è dovuto alla incapacità dello zucchero di penetrare nella cellula batterica: egli consiglia di eseguire, per questi ceppi, il test ONPG per valutare le potenziali capacità fermentative del ceppo in esame.
- I ceppi fermentanti mostrano il viraggio al giallo del terreno lungo tutte e due le provette. I ceppi con metabolismo ossidativo inducono un viraggio al giallo nella provetta aperta solo sulla superficie del terreno che, solo nel tempo, diffonde lungo tutto il terreno. Quando l'ossidazione è debole o lenta, si può osservare un'iniziale reazione alcalina sulla superficie della provetta aperta che persiste per alcuni giorni, ma, prolungando il tempo di incubazione, alla fine si ha il viraggio al giallo.³
- Hugh e Leifson¹ riportano che alcuni cosiddetti "paracolon bacilli" possono avere un metabolismo sia ossidativo che fermentativo. In questi casi l'ossidazione non è evidente a meno che la fermentazione sia lenta o ritardata. Questo insieme di bacilli Gram negativi (*Citrobacter*, *S.Arizonae*) sono in grado di ossidare e/o fermentare il lattosio.
- Le colonie microbiche, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche con il test OF, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti biologici. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1953; 66:24-26
- Public Health England. Oxidation/Fermentation of Glucose Test. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 27 Issue 3, 2015
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- Barrow GI, Feltham RKA. Bacterial characters and characterization. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999
- Finogold SM, Martin WJ, Scott EG. Bailey and Scots Diagnostic Microbiology, 5th ed., St.Louis: The C.V. Mosby Company, 1978, pp 124, 184, 453.
- Sivendra R. One-tube oxidation-fermentation methods: limitations posed by atypical fermentative reactions. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31(5):778-80
- Lederberg J. The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, strain K-12. *J.Bacteriol* 1950; 60: 381

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

