

EC BROTH MUG

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per la fase di conferma nelle procedure di ricerca e conteggio di *Escherichia coli* negli alimenti e nelle acque.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Triptone	20,0 g
Lattosio	5,0 g
Potassio fosfato bibasico	4,0 g
Potassio fosfato monobasico	1,5 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sali biliari n. 3	1,5 g
Triptofano	1,00 g
4-methylumbelliferone beta-D-glucuronide (MUG)	0,05 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il terreno di coltura per *Escherichia coli* (EC) è stato introdotto per la prima volta da Hajna e Perry per migliorare la rilevazione selettiva dei batteri coliformi e la rilevazione presuntiva di *E. coli* in acqua, alimenti, crostacei, latte e altri materiali.^{1,2} Feng e Hartman³ hanno sviluppato un terreno di coltura EC con 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG) per uno screening rapido della rilevazione di *E. coli*. Moberg⁴ ha riferito che una concentrazione di MUG di 50 µg/mL forniva la stessa intensità di fluorescenza blu dei livelli di MUG di 100 µg/mL. Koburger e Miller⁵ hanno raccomandato il brodo EC con MUG per testare la contaminazione dei molluschi. Approvato dalla U.S. Environmental Protection Agency⁶, l'EC-MUG è un metodo efficace e rapido per la rilevazione e la verifica di *E. coli* in campioni di cibo, acqua e ambiente⁷.

L'EC Broth MUG è raccomandato dalla FDA-BAM⁸ per il test MPN di conferma per l'*E. coli* nelle carni dei molluschi e dall'APHA⁹ per il test di conferma dell'*E. coli* o dei coliformi termotolleranti e dell'*E. coli* nei campioni d'acqua.

Le provette MUG EC Broth vengono inoculate con brodo proveniente da provette presunte positive di Lauryl Sulphate Broth e incubate a 44,5 ± 0,2°C per 24 ± 2 h. Se si produce fluorescenza, il test è positivo e indica la presenza di *E. coli*. La presenza di coliformi termotolleranti e di *E. coli* può essere determinata contemporaneamente includendo una provetta di Durham nelle provette di EC Broth.⁹

Il triptone fornisce azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica; il lattosio è un carboidrato fermentabile. I fosfati sono utilizzati come agenti tampone per controllare il pH del terreno di coltura. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. I sali biliari n° 3 inibiscono lo sviluppo dei batteri Gram-positivi, in particolare bacilli ed enterococchi, favorendo al contempo la crescita di *E. coli*. Il MUG viene scisso dalla β-D-glucuronidasi prodotta da *E. coli* in 4-metilumbelliferone e glucuronide; il 4-metilumbelliferone fluorogenico può essere determinato direttamente utilizzando una luce ultravioletta a onde lunghe (lampada di Wood). Il triptofano viene aggiunto al terreno di coltura per migliorare le prestazioni del test rapido diretto dell'indolo nelle provette EC Broth MUG.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 38 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Scaldare leggermente per sciogliere completamente la polvere, mescolare bene e distribuire in aliquote da 10 mL in provette contenenti una provetta di Durham capovolta. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Le provette Durham non devono contenere bolle d'aria dopo la sterilizzazione.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in flacone e in piastra	giallo chiaro, limpido
pH finale (20-25 °C)	6,9 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
EC Broth MUG	Terreno di coltura in polvere	4014262	500 g (13,2 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette, provette Durham, mezzi di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Alimenti, acque, acqua di mare e molluschi. Fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili per la raccolta dei campioni. Operare in conformità alle buone pratiche di laboratorio per la raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni in laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Per il test di conferma di *E. coli* procedere come segue⁸:

- Da ciascuna delle provette incubate con Lauryl Pepto Bios Broth a singola e doppia resistenza (REF 401580) che mostrano opacità, torbidità o qualsiasi gas visibile, inoculare con un'ansa di campionamento una provetta di EC Broth MUG.
- Incubare le provette a 44,5 ± 0,2°C per 24 ore ± 2 ore.
- Se necessario, eseguire il test dell'indolo aggiungendo poche gocce di Reagente di Kovac (REF 19171000) alle provette di EC Broth MUG.

Per la suddivisione di *E. coli* dai coliformi totali MF procedere come segue⁹:





1. Rimuovere la membrana contenente colonie di coliformi totali dal terreno di coltura (ad es. LES Endo Agar), arrotolarla con cura e inserirla in una provetta di EC Broth MUG. In alternativa, rimuovere le colonie con un tampone e inoculare una provetta di EC Broth MUG o, se è richiesta la quantificazione, inoculare singole colonie nel brodo.
2. Entro 30 minuti immergere tutte le provette in un incubatore a bagnomaria a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ per 24 ore \pm 2 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di crescita (torbidità) e di una fluorescenza blu brillante sotto una luce UV a onde lunghe (366 nm) (con o senza produzione di gas) sono considerate una conferma della presenza di *E. coli*.⁷

Test dell'indolo: la comparsa di un colore rosso distinto nello strato superiore è un test positivo.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente finale può eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	44°C/24H/A	crescita, con fluorescenza sotto lampada di Wood
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	44°C/24H/A	crescita, senza fluorescenza sotto lampada di Wood
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	44°C/24 H/A	inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di EC Broth disidratato e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 44°C per 24-48 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita e la produzione di gas nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto da testare (G_{TB}).

La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *E. coli* ATCC 25925 e *E. coli* ATCC 8739. L'indice di produttività $G_{\text{RB}}/G_{\text{TB}}$ per ogni ceppo target è ≤ 1 , le provette presentano gas nelle provette Durham e la fluorescenza sotto la lampada di Wood.

La specificità è testata con diluizioni appropriate del ceppo non target *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E. aerogenes* ATCC 13048. Dopo l'incubazione, il ceppo mostra una buona crescita senza produzione di gas.

Dopo l'incubazione i ceppi mostrano una buona crescita senza fluorescenza sotto la lampada di Wood.

La selettività è stata testata con diluizioni appropriate di ceppi non bersaglio *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo l'incubazione delle provette inoculate, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

13 – LIMITE DEL METODO

- È stato riportato che circa il 40% delle specie di *Shigella*, vari bio-sierotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* sottogenere I) possono essere positivi alla β -glucuronidasi e fluorescenti alla lampada di Wood; solo eccezionalmente questo test è positivo con ceppi di *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).¹⁰⁻¹²
- Circa il 3-4% degli *E. coli* è negativo alla β -glucuronidasi, in particolare i ceppi di *E. coli* O157¹¹.
- È stato riportato che fino al 10% degli *E. coli* fermentano lentamente o senza lattosio, ma dovrebbero essere positivi alla MUG.^{8,13}
- Poiché la temperatura di incubazione è fondamentale, si raccomanda l'uso di colture sommerse e impermeabilizzate o l'uso di un incubatore che sia in grado di mantenere la temperatura a $44,5^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ in tutta la camera per un periodo di 24 ore.⁹

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è 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 materiali 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, 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

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a $+2^\circ\text{C} / +8^\circ\text{C}$ al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo la FDA-BAM, il brodo EC MUG preparato può essere conservato in frigorifero per un massimo di 1 mese in provette con tappo a vite.⁸

16 - BIBLIOGRAFIA

- Hajna AA, Perry CA. Comparative study of presumptive and confirmative media for bacteria of the coliform group and for fecal streptococci. Am J Public Health 1943; 33:550-556.
- Perry CA, Hajna AA. Further evaluation of EC medium for the isolation of coliform bacteria and Escherichia coli. Am. J. Public Health 1944; 34:735-738.
- Feng, P. C. S., and P. A. Hartman. 1982. Fluorogenic assay for immediate confirmation of Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 43:1320-1329.
- Moberg, L. J. 1985. Fluorogenic assay for rapid detection of Escherichia coli in food. Appl. Environ. Microbiol. 50:1383-1387.
- Koburger, J. A., and M. L. Miller. 1985. Evaluation of a fluorogenic MPN procedure for determining Escherichia coli in oysters. J. Food Prot. 48:244-245
- United States Environmental Protection Agency, Office of Water. 1991. Test methods for Escherichia coli in drinking water. EC medium with Mug tube procedure and Nutrient agar with Mug membrane filter procedure. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. <http://nepis.epa.gov/>
- Cheeptham N, Lal A. Use of EC-MUG Media to Confirm Escherichia coli Contamination in Water. ASM Protocol 23 August 2010.
- FDA-BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Content current as of:10/09/2020
- APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd ed. 2017.
- Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl- D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of E. coli. J Clin Microbiol 1984; 19 :172.
- Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl. Environ. Microbiol. 48:285-288
- Kaluzewski S, D Tomczuk D. Evaluation of the Usefulness of Tests for Production of Beta-D-glucuronidase and Propylene Glycol Utilization for the Differentiation of Enterobacteriaceae Rods. Med Dosw Mikrobiol, 1995; 47:155-68.
- Gokul Yaratha, MD, Sarah Perloff, DO, Kinesh Changala, MBBS. Lactose vs non-lactose fermenting E. coli: Epidemiology, Clinical Outcomes, and Resistance. Open Forum Infect Dis 2017; V4 (Suppl 1)

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	Utilizzare entro	Fabbricante	
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

