



ENTEROBACTERIACEAE (EE) BROTH MOSSEL

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la rilevazione e il conteggio delle *Enterobacteriaceae* negli alimenti.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA *

Peptone	10,000 g
Glucosio	5,000 g
Sodio fosfato bibasico	6,450 g
Potassio fosfato monobasico	2,000 g
Oxgall	20,000 g
Verde brillante	0,014 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Le *Enterobacteriaceae* possono essere danneggiate nelle procedure di lavorazione degli alimenti e sono solitamente considerate dai produttori di alimenti come indicatori di igiene e quindi utilizzate per monitorare l'efficacia delle misure preventive adottate.

Enterobacteriaceae Enrichment (EE) Broth Mossel è una modifica del Brilliant Green Bile Lactose Broth ideato da Mossel, Visser e Cornelissen¹, che a sua volta è una modifica del terreno liquido MacConkey.

Il terreno è preparato secondo la formulazione descritta nella norma ISO 21528:2004 ora ritirata.²

EE Broth Mossel può essere utilizzato per l'arricchimento selettivo, la rilevazione e il conteggio delle *Enterobacteriaceae* con la tecnica MPN, soprattutto quando si prevede che i microrganismi target siano in numero ridotto e necessitino di essere rivitalizzati.

Il terreno contiene verde brillante e bile come agenti inibitori per i batteri Gram-positivi, glucosio come principale fonte di energia e peptone che fornisce i fattori essenziali per la crescita. I fosfati sono gli agenti tampone per controllare il pH del terreno, l'inibizione della crescita nelle prime fasi dell'arricchimento e l'autosterilizzazione alla fine.³

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 43,5 g in 1000 mL di acqua depurata fredda. Scaldare per sciogliere completamente e dispensare volumi da 100 mL in flaconi da 250 mL (o 10 mL in provette) e autoclavare a 121°C per 5 minuti. Raffreddare rapidamente sotto acqua corrente fredda. Se necessario, preparare il terreno in doppia concentrazione pesando 87 g/L.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, verde
Aspetto della soluzione	verde, limpida
pH finale (20-25 °C)	7,2 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
EE Broth Mossel	Terreno di coltura in polvere	4014662	500 g (11,5 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, piastre Petri, beute, provette e flaconi, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Materiali di importanza sanitaria come prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali, campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione degli alimenti. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle norme di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Procedura generale

Prelevare un campione (x g o x mL) a seconda della sensibilità richiesta, aggiungere 9x mL di Buffered Peptone Water (REF 401278) e omogeneizzare.

Trasferire il volume appropriato in un contenitore sterile in base al limite di rilevazione richiesto. Incubare a 37 °C per 18 h ± 2 h.

Trasferire 1 mL della coltura ottenuta in Buffered Peptone Water in una provetta contenente 10 mL di EE Broth Mossel.

Incubare il brodo inoculato in condizioni aerobiche a 37 °C per 22 ± 2 ore.

Utilizzando un'ansa, inoculare la superficie di una piastra di Violet Red Bile Glucose Agar (REF 402188) con il terreno di arricchimento incubato e incubare la piastra a 37 °C per 24 ore ± 2 ore.

Conteggio delle *Enterobacteriaceae* con la tecnica MPN

Inoculare le provette di EE Broth a concentrazione singola e doppia in triplicato con 1 mL e 10 mL di campione e le loro rispettive diluizioni decimali. Incubare a 37°C per 22 ± 2 ore.

Strisciare un'ansa da ogni provetta su piastre di Violet Red Bile Glucose Agar e incubare a 37°C per 24 ore ± 2 ore.

Procedura di presenza-assenza

- Inoculare 1 g o 1 mL di campione alimentare opportunamente diluito in un flacone contenente 10 mL di Tryptic Soy Broth (REF 402155) e incubare a 20-25°C per 2 ore, agitando il flacone ogni 15 minuti per 30 secondi.

- Aggiungere 10 mL di EE Broth a doppia concentrazione e incubare a 37°C per 22 ± 2 ore.

- Mescolare bene e osservare la torbidità dovuta alla crescita batterica.

- Dai flaconi positivi alla crescita, trasferire un'ansa su una piastra di Violet Red Bile Glucose Agar e incubare a 37°C per 24 ore ± 2 ore.



10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una torbidità con qualche viraggio di colore verso il verde-giallastro fornisce una prova presuntiva della presenza di *Enterobacteriaceae*. Le colonie tipiche di *Enterobacteriaceae* su Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar sono di colore da rosa a rosso o viola (con o senza aloni di precipitazione).

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti del prodotto vengono messi in vendita dopo l'esecuzione dei test del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore 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 riportati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità del terreno di coltura.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 8739	37°/ 24 H-A	crescita con gas
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°/ 24 H-A	parzialmente inibito

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di EE Broth Mossel disidratato viene sottoposto a test di produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo della diluizione ad estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di organismi target in provette, incubando a 37°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto di prova (G_{TB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *E. coli* ATCC 8739, *E. aerogenes* ATCC 13028S, *S. Typhimurium* ATCC 14028. L'indice di produttività $G_{RB}-G_{TB}$ per ciascun ceppo in esame deve essere ≤ 1 .

La produttività e la selettività sono testate anche con miscele di diluizioni appropriate di ceppi target e non target: *E. coli* ATCC 25922 + *E. faecalis* ATCC 19433 e *S. Enteritidis* ATCC 13076 + *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo l'incubazione delle provette inoculate a 37°C per 24 ore e la subcoltura su VRBG Agar, i ceppi target mostrano più di 10 colonie sul terreno di coltura.

Inoltre, la selettività viene valutata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando in provette 1 mL di diluizioni decimali appropriate dell'organismo non target *E. faecalis* ATCC 19433, incubando a 37°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto di prova (G_{TB}). *E. faecalis* è parzialmente inibito e l'indice di selettività $G_{RB}-G_{TB}$ sarà ≥ -1 .

13 – LIMITE DEL METODO

- Questo terreno di coltura è sensibile al calore, evitare il surriscaldamento.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura deve essere utilizzato secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede 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 Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza 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 dei prodotti, 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

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°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'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Secondo Baird RM *et al.* il brodo in provetta può essere conservato in contenitori con tappo a vite a +2°C / +8°C per 1 mese.³

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Mossel DAA, Visser M, Cornelissen AMR. The Examination of Foods for Enterobacteriaceae using a Test of the Type Generally Adopted for the Detection of Salmonellae. *J Appl Bacteriol* 1963; 26:444.



2. ISO 21528-1:2004 - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment.
3. Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Proceedings of the 4th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Manchester 4-5 September, 1986. Int J Food Microbiol 1987; 5:216-217.

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 2	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

