



MODIFIED LAURYL SULFATE TRYPTOSE (mLST) BROTH BASE VANCOMYCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

MODIFIED LAURYL SULFATE TRYPTOSE (mLST) BROTH

Terreno di coltura in polvere, terreno pronto all'uso in provetta e supplementi selettivi

1 - DESTINAZIONE D'USO

Brodo di arricchimento selettivo per la ricerca di *Cronobacter sakazakii* nel latte e nei prodotti lattiero-caseari.

2 – COMPOSIZIONE*

M-CP AGAR BASE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA

Digerito Enzimatico di tessuto animale e vegetale	20,0 g
Lattosio	5,00 g
Potassio fosfato monobasico	2,75 g
Potassio fosfato Bibasico	2,75 g
Sodio lauril solfato	0,10 g
Sodio cloruro	34,00 g

VANCOMYCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (x fiala)

Vancomicina	25 mg
-------------	-------

MODIFIED LAURYL SULFATE TRYPTOSE (mLST) BROTH, PROVETTE

Digerito Enzimatico di tessuto animale e vegetale	20,0 g
Lattosio	5,00 g
Potassio fosfato monobasico	2,75 g
Potassio fosfato Bibasico	2,75 g
Sodio lauril solfato	0,10 g
Sodio cloruro	34,00 g
Vancomicina	10 mg
Acqua purificata	1000 mL

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Le specie *Cronobacter* (precedentemente note come *Enterobacter sakazakii*) sono batteri patogeni Gram-negativi a forma di bastoncino, mobili, della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Questi microrganismi sono considerati patogeni opportunisti associati a infezioni pericolose per la vita soprattutto nei neonati.¹ Le sindromi cliniche dell'infezione da *Cronobacter* comprendono l'enterocolite necrotizzante (NEC), la batteriemia e la meningite, con tassi di mortalità compresi tra il 40 e l'80%.^{1,2} Il batterio è stato isolato da una serie di fonti alimentari tra cui alimenti a base di latticini, carni essiccate, acqua, riso e altri.^{1,3,4}

Il brodo Modified Lauryl Sulfate Tryptose (mLST) è un brodo selettivo per la fase di arricchimento della procedura di isolamento di *Cronobacter*.

L'uso di Buffered Peptone Water come arricchimento non selettivo, mLST Broth come arricchimento selettivo e Enterobacter Sakasakii Isolation Agar (ESIA REF 401478), consente il rilevamento specifico di *C.sakazakii* in campioni di alimenti, specialmente nel latte in polvere e nel latte artificiale in polvere. I suddetti terreni di coltura e la procedura di lavoro descritta di seguito sono conformi allo standard ritirato ISO/TS 22964:2006⁴, sostituito dallo standard ISO 22964:2017.⁵

I fattori di crescita essenziali sono forniti dal digerito enzimatico del tessuto animale e vegetale che è una fonte di azoto, carbonio, amminoacidi e minerali. Il lattosio è un carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia. I fosfati fungono da sistema tampone. L'elevata concentrazione di cloruro di sodio e l'agente tensioattivo sodio lauril solfato agiscono come agenti selettivi nel limitare la crescita di batteri diversi dai coliformi, mentre la vancomicina è inibitoria per i batteri Gram-positivi.

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 32,3 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare per sciogliere e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente e aggiungere 1 mL di Vancomycin Antimicrobial Supplement (REF 4240057), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Concentrazione finale di vancomicina nel terreno: 10 mg/L. Mescolare bene e distribuire in provette sterili (10 mL/provetta) in condizioni asettiche. La soluzione di vancomicina può essere conservata a una temperatura compresa tra 0 °C e 5 °C per 15 giorni.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallo chiaro
Aspetto del terreno in soluzione e in provetta	giallo chiaro, limpido
Aspetto del supplemento liofilizzato	pastiglia alta, soffice e bianca. Dopo ricostituzione soluzione limpida e incolore.
pH (20-25°C)	6,8 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Modified Lauryl Sulfate Tryptose (mLST) Broth Base	Terreno di coltura in polvere	4014762	500 g (7,7 L)
Vancomycin Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240057	10 flaconi, (25 mg/flacone)
Modified Lauryl Sulfate Tryptose (mLST) Broth	Provette pronte all'uso	551476	20 x 10 mL





7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, flaconi sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Latte in polvere, latte artificiale in polvere e campioni ambientali nel settore della produzione alimentare e della manipolazione degli alimenti. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

1. Preparare la sospensione iniziale del campione (diluizione primaria) aggiungendo x g del campione da analizzare a 9 volte x mL di Buffered Peptone Water Casein (REF 401278C): ad esempio, 25 g + 225 mL di Buffered Peptone Water Casein o 10 g + 90 mL di Buffered Peptone Water Casein.
2. Incubare a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18 ± 2 ore.
3. Dopo l'incubazione del terreno di pre-arricchimento inoculato, trasferire 0,1 mL della coltura ottenuta in 10 mL mLST Broth.
4. Incubare a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.
5. Dopo l'incubazione, strisciare un'ansa da 10 μ dal brodo mLST sulla superficie della piastra ESIA (REF 401478) e incubare a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di microrganismi nel brodo mLST è indicata da un diverso grado di torbidità, granelli e flocculazione.

Subcoltura su piastre ESIA:

Risultato presunto positivo per *C. sakazakii*: presenza di colonie da blu a verdi, da 1 a 3 mm di diametro.

Risultato negativo per *C. sakazakii*: assenza delle tipiche colonie blu-verdi o presenza di colonie malva-viola.

Confermare le colonie con i test biochimici raccomandati dalla norma ISO 22964.

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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 facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. sakazakii</i> ATCC 29544	44°C / 24 h / A	crescita
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	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, campioni rappresentativi di tutti i lotti di brodo mLST disidratato addizionato con vancomicina e provette pronte per l'uso vengono testati per produttività e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione ad estinzione, inoculando 1 mL di opportune diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 44°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento (Gr_{RB}) e nel lotto di prova (Gr_{TB}). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *C. sakazakii* ATCC 29544 e *C. mytjensii* ATCC 51329. L'indice di produttività $Gr_{RB}-Gr_{TB}$ per ciascun ceppo di prova deve essere ≤ 1 .

La selettività è valutata con i seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 44°C per 24 ore, *E. coli* mostra crescita, mentre la crescita di *S. aureus* è totalmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- *Cronobacter* può essere presente in quantità ridotte nei campioni, insieme ad altre *Enterobacteriaceae*, come *E. cloacae*, che possono interferire nella determinazione del microrganismo target.⁵
- Alcuni coliformi crescono su ESIA con colonie viola, facilmente distinguibili dalle colonie blu di *C. sakazakii*.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura, il supplemento e le provette pronte all'uso qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Vancomycin Antimicrobial Supplement è classificato come pericoloso secondo la normativa vigente. 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.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro. Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Ogni provetta di questo terreno di coltura è monouso.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente 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

Provette pronto all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni le provette sono valide fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le provette estratte dal confezionamento secondario possono essere utilizzate sino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere usate immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare le provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

Terreno disidratato

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, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento liofilizzato

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

Secondo ISO/TS 22964:2006, le provette di terreno mLST/vancomicina preparate in autonomia possono essere conservate ad una temperatura compresa tra 0 °C e +5 °C per 1 giorno e la soluzione di vancomicina inutilizzata può essere conservata a una temperatura compresa tra 0 °C e +5 °C per 15 giorni.

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Carol Iversen *et al.*, The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies BMC Evol Biol. 2007; 7: 64.
2. Simmons BP *et al.* *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. Infect Control Hosp Epidemiol 1989; 10: 398.
3. Van Acker J *et al.* Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *E. sakazakii* in powdered milk formula. J Clin Microbiol 2001; 39:293-297.
4. ISO/TS 22964:2006. Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*
5. ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	Monouso	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
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.

