

**MODIFIED LAURYL SULFATE TRYPTOSE (mLST)  
BROTH BASE  
ENTEROBACTER SAKAZAKII ISOLATION AGAR (ESIA)**  
Brodo d'arricchimento selettivo e terreno selettivo cromogeno  
per la ricerca specifica di *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*

**FORMULE TIPICHE**

**mLST BROTH BASE –POLVERE (g/L)**

|   |       |
|---|-------|
| PEPTONE*  | 20.00 |
| LATTOSIO  | 5.00  |
| POTASSIO FOSFATO MONOBASICO                         | 2.75  |
| POTASSIO FOSFATO BIBASICO                           | 2.75  |
| SODIO LAURIL SOLFATO                                | 0.10  |
| SODIO CLORURO                                       | 34.00 |
| * DIGERITO ENZIMATICO DI TESSUTO ANIMALE E VEGETALE |       |

**ESIA - POLVERE E PIASTRE (g/L)**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| PEPTONE                | 7.00  |
| ESTRATTO DI LIEVITO    | 3.00  |
| SODIO CLORURO          | 5.00  |
| SODIO DESOSSICOLATO    | 0.60  |
| VIOLETTO CRISTALLO     | 0.002 |
| X- $\alpha$ -GLUCOSIDE | 0.150 |
| AGAR                   | 15.00 |

**VANCOMYCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (x fiala)**

|             |       |
|-------------|-------|
| VANCOMICINA | 25 mg |
|-------------|-------|

**mLST BROTH – PROVETTE (g/L)**

|   |       |
|---|-------|
| PEPTONE*  | 20.00 |
| LATTOSIO  | 5.00  |
| POTASSIO FOSFATO MONOBASICO                         | 2.75  |
| POTASSIO FOSFATO BIBASICO                           | 2.75  |
| SODIO LAURIL SOLFATO                                | 0.10  |
| SODIO CLORURO                                       | 34.00 |
| VANCOMICINA   | 0.01  |
| * DIGERITO ENZIMATICO DI TESSUTO ANIMALE E VEGETALE |       |

**PREPARAZIONE DEI TERRENI IN POLVERE****Modified Lauryl Sul fate Tryptose (mLST) Broth Base**

Sospendere 64.6 g in 1000 ml di acqua distillata. Scaldare fino a completa soluzione. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente, quindi aggiungere 2 ml del contenuto di una fiala di Vancomycin Antimicrobial Supplement (REF 4240057) precedentemente ricostituito con 5 ml di acqua distillata sterile (il supplemento così ricostituito può essere conservato per 1 mese a – 20 °C). Mescolare bene e distribuire in provette sterili da 10 ml con le cautele dell'asepsi.

pH finale 6.8 ± 0.2

**Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)**

Sospendere 30.8 g in 1000 ml di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione, autoclavare a 121 °C per 15 minuti; raffreddare a 45-50 °C e distribuire in piastre petri sterili

pH finale 7.0 ± 0.2

**DESCRIZIONE**

*Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* è un bastoncino Gram negativo, riconosciuto nel 1980 dal microbiologo giapponese Riichi Sakazakii come variante pigmentata di giallo di *Enterobacter cloacae* e denominato in suo onore *Enterobacter sakazakii*. Recenti studi di biologia molecolare (Carol Iversen et al.) hanno evidenziato che, riconducibili ad *E.sakazakii*, vi sono numerose genomospecie e gli autori hanno provveduto ad una loro riclassificazione all'interno del genere *Cronobacter* della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

*Cronobacter sakazakii* è un patogeno opportunista, coinvolto in meningiti, sepsi, enterocoliti necrotizzanti ed ascessi cerebrali in neonati immaturi o immunocompromessi con elevati tassi di mortalità. E' altresì responsabile di infezioni nosocomiali.

Le patologie sono state associate al consumo di preparati per neonati in polvere a base di latte o di soia, contaminati da *C.sakazakii*. Episodi di infezioni sono stati segnalati nelle unità di terapia intensiva neonatale in Canada, USA, UK, Grecia, Olanda.

mLST Broth è un brodo selettivo preparato in accordo alla norma ISO/TC 22964 che consente l'arricchimento nel campione dei bastoncini Gram negativi ed in particolare di *Cronobacter* spp.

Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA) è un terreno selettivo per Gram negativi preparato in accordo alla norma ISO/TC 22964 contenente un composto cromogenico per la differenziazione di *Cronobacter sakazakii* che coltiva con colonie blu.

L'impiego di Buffered Peptone Water come arricchimento non selettivo, di mLST Broth come arricchimento selettivo e del terreno d'isolamento ESIA, preparati in accordo alle formulazioni indicate dalla Norma ISO/TS 22964, consentono la ricerca specifica *C.sakazakii* nei campioni alimentari ed in particolare nel latte in polvere o in prodotti preparati con latte in polvere.

**METODO D'IMPIEGO**

Il metodo ISO/TC 22964 raccomanda la seguente procedura:

- Sospendere il campione in esame in Buffered Peptone Water (REF 401278) in rapporto 1:9 (es. 25 g di campione in 225 ml di BPW). Incubare a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $18 \pm 2$  ore.
- Eseguire una subcultura di 0,1 ml dal brodo BPW in una provetta contenente 10 ml di mLST Broth Incubare a  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 2$  ore.
- Facendo uso di un'ansa trapiantare 10  $\mu\text{l}$  dal brodo mLST su una piastra di ESIA ed incubare a  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 2$  ore.
- Esaminare le colonie con morfologia e colore caratteristico:  
Risultato positivo presuntivo: presenza di colonie tipiche color blu, con diametro da 1 a 3 mm  
Risultato negativo: assenza di colonie tipiche blu o presenza di colonie color malva (assenza di *C.sakazakii*)
- Confermare le colonie con i test biochimici raccomandati dalla norma ISO/TS 22964

**Controllo qualità dell'utilizzatore (mLST Broth)**

Controllo della produttività  
*C.sakazakii* buona crescita  
Controllo della selettività  
*S.aureus* ATCC 25923: inibito  
Incubazione a  $44^\circ\text{C}$  per 24 ore.

**Controllo qualità dell'utilizzatore (ESIA)**

Controllo della produttività  
*C.sakazakii* buona crescita, colonie color blu  
Controllo della specificità  
*Enterobacter gergoviae*: buona crescita, colonie color porpora  
Controllo della selettività  
*S.aureus* ATCC 25923: inibito  
Incubazione a  $44^\circ\text{C}$  per 24 ore.

**CONSERVAZIONE**

mLST Broth Base in polvere: conservare a  $10-30^\circ\text{C}$   
ESIA in polvere: conservare a  $2-8^\circ\text{C}$   
Conservare i terreni pronti in provetta ed in piastra fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a  $2-8^\circ\text{C}$ .  
Eliminare se vi sono segni di deterioramento

**LIMITI**

Alcuni coliformi coltivano su ESIA con colonie violetto, facilmente distinguibili dalle colonie blu di *C.sakazakii*.

**PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI**

Il preparato mLST Broth Base qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni  $\geq 1\%$ .  
Il preparato ESIA qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente ma contiene sodio desossicolato in concentrazione  $> 1\%$  e come tale richiede la scheda di sicurezza che deve essere consultata prima dell'uso.  
I prodotti qui descritti devono essere usati in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le provette e le piastre dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

**BIBLIOGRAFIA**

- Carol Iversen et al., BMC Evol Biol. 2007; 7: 64.
- ISO/TS 22694:2006 Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*
- Simmons, B.P. et al. (1989) *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 10: 398.
- Van Acker, J et. Al. (2001) Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *E.sakazakii* in powdered milk formula. J.Clin.Microbiol. 39:293-297.

**CONFEZIONI TERRENI IN POLVERE**

|         |   |                |
|---------|---|----------------|
| 4014762 | Modified Lauryl Sul fate Tryptose (mLST) Broth Base | 500 g (7,8 L)  |
| 4014782 | Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)        | 500 g (16,2 L) |
| 4014781 | Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)        | 100 g (1,5 L)  |

**SUPPLEMENTO**

|         |                                     |   |
|---------|-------------------------------------|---|
| 4240057 | Vancomycin Antimicrobial Supplement | 10 FIALE, CIASCUNA PER 2,5 LITRI DI TERRENO |
|---------|-------------------------------------|---|

Il terreno è disponibile anche pronto per l'uso:

|         |  |   |
|---------|--|---|
| 5514762 | Modified Lauryl Sul fate (mLST) Broth        | 20x10 ml (provette pronte)  |
| 541478  | Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA) | 20 piastre da 90 mm, confezionate in film e in scatola di cartone |