



LAURYL SULPHATE BROTH MUG IDF FORMULATION

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno fluorogenico selettivo per il conteggio di *Escherichia coli* e coliformi nel latte, prodotti lattiero-caseari e altri materiali di importanza sanitaria.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Triptosio	20,00 g
Lattosio	5,00 g
MUG	0,10 g
Sodio cloruro	5,00 g
Potassio fosfato bibasico	2,75 g
Potassio fosfato monobasico	2,75 g
L-triptofano	1,00 g
Sodio laurilsolfato	0,10 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il Lauryl Sulfate Broth (LSB) è stato introdotto per la prima volta da Mollan e Ourby.¹ Il test rapido per *E. coli* è stato sviluppato da Feng e Harman² utilizzando LSB integrato con il composto 4-metilumbelliferone glucuronide (MUG), che viene idrolizzato dalla glucuronidasi per produrre un prodotto fluorogenico.

Lauryl Sulphate Broth with MUG (LSB MUG) è raccomandato da ISO 11866-1:2005 [IDF 170-1:2005]³ per il rilevamento simultaneo di *E. coli* e coliformi nel latte e nei prodotti lattiero-caseari e da FDA-BAM⁴ e AOAC⁵ per il rilevamento *E. coli* negli alimenti refrigerati o congelati, esclusi i crostacei.

Il brodo è specificamente progettato per consentire una rapida moltiplicazione e un'abbondante produzione di gas da un piccolo inoculo di organismi target.⁶

I fattori di crescita essenziali sono forniti dal triptosio che è una fonte di azoto, carbonio, amminoacidi e minerali; il lattosio è un carboidrato fermentabile. I fosfati fungono da sistema tampone e il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. L'agente tensioattivo sodio lauril solfato agisce come agente selettivo limitando la crescita di batteri diversi dai coliformi.⁶ I coliformi cresciuti in LSB MUG fermentano il lattosio e producono gas mentre altri batteri vengono inibiti o crescono senza produrre gas. 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 ad onde lunghe (lampada di Wood). La presenza di 1 g/L di triptofano migliora la rilevazione della triptofanasi mediante la reazione dell'indolo.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 36,7 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente se necessario per sciogliere completamente la polvere. Distribuire 10 mL in provette da 16 x 160 mm contenenti una provetta di Durham capovolta. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Nel caso di doppia concentrazione sospendere 71,2 g in 1000 mL di acqua depurata fredda e dispensare 10 mL in provette da 20x200 mm. I tubi di Durham non devono contenere bolle d'aria dopo la sterilizzazione.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	giallo chiaro, limpida
pH finale (20-25 °C)	6,8 \pm 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Lauryl Sulfate Broth MUG IDF Formulation	Terreno di coltura in polvere	401580F2	500 g (13,6 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Latte, latticini, alimenti refrigerati o surgelati, esclusi i crostacei. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare 3 provette di terreno "double-strength" e 3 provette "single-strength". Inoculare in ciascuna provetta rispettivamente 10 mL e 1 mL del campione in esame se liquido o della sospensione iniziale. Procedere allo stesso modo per ogni diluizione. Miscelare accuratamente l'inoculo con il terreno.

Incubare le provette a 30 °C \pm 1 °C per 24 \pm 2 ore. Se in questa fase non si osserva né formazione di gas né opacità che impedisce la formazione di gas, incubare fino a 48 \pm 2 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di crescita e la produzione di gas sono considerati un test positivo per la presenza di coliformi.

Eseguire il test di conferma per *E. coli* su tutte le provette:

- aggiungere a ciascuna provetta 0,5 mL di NaOH 0,1 M e osservare la fluorescenza sotto una lampada di Woods
- aggiungere ad ogni provetta fluorescente 0,5 mL di Kovacs Reagent (cat. n° 19171000). Mescolare bene ed esaminare dopo 1 minuto per la formazione di un distinto colore rosso porpora nello strato superiore.





Identificare le provette che sviluppano fluorescenza e sono positive al test dell'indolo come *E. coli*.

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 25922	30°C/48 H/A	crescita, produzione di gas e fluorescenza sotto lampada di Wood
<i>C. freundii</i> ATCC 43864	30°C/48 H/A	crescita, produzione di gas, senza fluorescenza
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	30°C/48 H/A	crescita parzialmente inibita

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Lauryl Sulfate Broth MUG IDF Formulation disidratato, viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali degli organismi target in provette, incubando a 30°C per 24 e 48 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita, produzione di gas, fluorescenza sotto la lampada di Wood, positività al test dell'indolo diretto, nel lotto di Riferimento (Gr_{RB}) e nel lotto in esame (Gr_{TB}).

La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *E. coli* ATCC 25925 e *E. coli* ATCC 8739. L'indice di produttività $Gr_{RB}-Gr_{TB}$ per ciascun ceppo è ≤ 1 e le provette presentano gas nelle provette di Durham, fluorescenza sotto la lampada di Wood e positività al test dell'indolo.

La specificità è testata con opportune diluizioni dei ceppi coliformi *C. freundii* ATCC 43864 e *K. pneumoniae* ATCC 27736 e del ceppo lattosio negativo *S. Typhimurium* ATCC 14028. Dopo l'incubazione, i coliformi mostrano una buona crescita con gas, senza fluorescenza alla lampada di Wood e negativi test dell'indolo mentre *Salmonella* mostra una buona crescita senza gas, senza fluorescenza alla lampada di Wood e test dell'indolo negativo.

La selettività è testata con opportune diluizioni del ceppo non target *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo l'incubazione, la crescita del ceppo non target è parzialmente inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- È stato riportato che circa il 40% delle specie *Shigella*, vari bio-sierotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* subgenere I) possono essere β -glucuronidasi positive e fluorescenti sotto la lampada di Wood; solo eccezionalmente questo test è positivo con i ceppi *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).⁷⁻⁹
- Circa il 3-4% di *E. coli* è β -glucuronidasi negativo, in particolare i ceppi di *E. coli* O157.⁸
- È stato segnalato che fino al 10% di *E. coli* fermenta lentamente o non fermenta il lattosio, ma dovrebbe essere MUG-positivo.^{4,10}

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
- 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 +2°C / +8°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).

16 - BIBLIOGRAFIA








- Mallmann WL, Darby CW. Uses of a Lauryl Sulfate Tryptose Broth for the Detection of Coliform Organisms. Am J Public Health Nations Health. 1941 Feb;31(2):127-34.
- Feng, P. C. S., and P. A. Hartman. 1982. Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1320-1329.
- ISO 11866-1:2005 [IDF 170-1:2005] Milk and milk products — Enumeration of presumptive *Escherichia coli* — Part 1: Most probable number technique using 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG).





4. FDA-BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Content current as of:10/09/2020
5. Moberg, L.J., M.K. Wagner, and L.A. Kellen. Fluorogenic assay for rapid detection of Escherichia coli in chilled and frozen foods: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988; 71:589-602.
6. 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; 195-196.
7. Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl- D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of E. coli. J Clin Microbiol 1984; 19 :172.'
8. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl. Environ. Microbiol. 48:285-288
9. Kaluzewski SD, 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.
10. 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	02/2023

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

