



LITMUS MILK

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido per la differenziazione di microrganismi basati su reazioni metaboliche multiple e per il mantenimento di batteri lattici.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Latte scremato	100,00 g
Litmus	0,75 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Litmus Milk è stato utilizzato per molti anni come aiuto nella differenziazione degli organismi (specialmente all'interno del genere *Clostridium*) sulla base di molteplici reazioni metaboliche sul latte, tra cui la fermentazione, la riduzione, la formazione di coaguli, la digestione e la formazione di gas.¹ È anche utile per il mantenimento e la propagazione dei batteri lattici.

Il Litmus (tornasole) incorporato nel terreno di coltura è un indicatore di pH e di ossido-riduzione. Il latte contiene lattosio e tre proteine principali: caseina, lattoalbumina e lattoglobulina. A pH 6,5 il terreno è di colore blu pallido; quando viene inoculato con microrganismi fermentanti il lattosio, che producono acido lattico e occasionalmente acido butirrico, diventa rosso-rosa attraverso la reazione del tornasole. Alcuni batteri, che non fermentano il lattosio ma idrolizzano la caseina, rendono il terreno alcalino con un odore sgradevole e lo trasformano in un colore blu-violaceo. Alcuni organismi rimuovono l'ossigeno nel terreno di coltura per mezzo di una reductasi, con riduzione del tornasole a base di leuco bianco.

Il fenomeno della peptonizzazione è dovuto alla digestione della caseina, che si manifesta con una schiaritura del terreno. La rottura del coagulo indica la produzione di gas da parte del ceppo inoculato.

La produzione di acido dalla fermentazione del lattosio è evidenziata da un cambiamento di colore dell'indicatore e, quando viene prodotto molto acido, dalla formazione di un coagulo. Ma un'altra forma di coagulo può essere prodotta dal caglio; in questo caso il coagulo si forma prima e poi, come il coagulo di fibrina nel sangue, si contrae ed esprime un siero chiaro. Il coagulo acido, invece, non si contrae. Quando il batterio produce anche enzimi proteolitici, il coagulo può essere peptonizzato.²

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Mescolare 100 g con una piccola quantità di acqua fredda purificata, ottenendo una pasta liscia e aggiungere altra acqua purificata fino a ottenere una miscela al 10% (100 g/L). Agitare continuamente la miscela e dispensare quantità di 5-10 mL in provette con tappo a vite. Sterilizzare a vapore (100°C) per tre giorni consecutivi per 60, 45 e 80 minuti. In alternativa, sterilizzare in autoclave a 121°C per 5 minuti o a 110°C per 10 minuti. Evitare il surriscaldamento per evitare la caramellizzazione.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere
Aspetto della soluzione

Fine granulometria omogenea, grigio-blu
blu pallido con precipitato rosa-blu, opaco. Durante la sterilizzazione in autoclave il tornasole si riduce a una base di colore bianco; tuttavia, al raffreddamento, l'ossigeno viene assorbito e il colore originale ritorna.
6,5 ± 0,2

pH finale (20-25 °C)

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Litmus Milk	Terreno di coltura in polvere	4016112	500 g (5 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette con tappo a vite, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Campioni di colture pure (18-24 in brodo).

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

- Inoculare con 4 gocce di una coltura pura in brodo di 18-24 ore.
- Incubare a 35-37°C in atmosfera aerobica.
- Se si sospetta la presenza di *Clostridium* o si desidera un'anaerobiosi, versare uno strato di olio minerale sterile sulla superficie del terreno di coltura subito dopo l'inoculazione.¹
- Osservare quotidianamente per sette giorni la reazione alcalina (il tornasole diventa blu), la riduzione dell'indicatore, il coagulo acido, la reazione acida (il tornasole diventa rosa), il coagulo del caglio e la peptonizzazione. Possono essere necessari periodi più lunghi, fino a 14 giorni.^{1,2}
- Registrare tutti i cambiamenti.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nel corso del periodo di osservazione possono verificarsi diversi cambiamenti.¹

- Rosso-rosa: reazione acida; lattosio e/o glucosio fermentati; rosso: lattosio fermentato, rosa: glucosio fermentato.
- Blu-violaceo: nessuna fermentazione del lattosio, nessun cambiamento del tornasole, stesso colore della provetta non inoculata.
- Blu: reazione alcalina; nessuna fermentazione del lattosio, l'organismo attacca le sostanze azotate per formare ammoniaca o ammine basiche.
- Bianco: riduzione del litmus a una base bianca da parte dell'enzima reductasi.





5. Formazione di coaguli o cagliata: coagulazione delle proteine del latte dovuta o alla precipitazione della caseina per formazione di acidi o alla conversione della caseina in paracaseina da parte dell'enzima rennina, con conseguente formazione di un liquido acquoso chiaro chiamato "siero".
6. Digestione (peptonizzazione): le proteine del latte vengono digerite; la digestione della caseina determina l'eliminazione del mezzo e la dissoluzione del coagulo.
7. Produzione di gas (H₂ e CO₂): bolle nel terreno e coagulo possono essere sciolti.
8. Coagulo disgregato ("stormy clot"): coagulo acido disgregato da un'abbondante produzione di gas.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti prodotti sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utente finale 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>C. perfringens</i> ATCC 13124	37°C / 3-5 giorni / AN	coagulazione acida e disgregata
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	37°C / 3-5 giorni / A	peptonizzazione (schiarimento)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 314	37°C / 3-5 giorni / A	acido, coagulo o cagliata

A: incubazione aerobica; AN: incubazione anaerobica; 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 Litmus Milk disidratato viene sottoposto a test di produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

Le reazioni metaboliche vengono testate inoculando il terreno di coltura con colture pure di organismi target, incubando a 37°C per 3-5 giorni e registrando i cambiamenti nel terreno. Il Litmus Milk è stato testato con i seguenti ceppi che hanno dato le seguenti reazioni: *C. perfringens* ATCC 13124 (reazione acida, colore rosa, coagulazione "stormy clot"), *L. acidophilus* ATCC 314 (reazione acida, colore rosa e coagulazione), *E. faecalis* ATCC 19433 (reazione acida, riduzione, da bianca a incolore), *P. vulgaris* ATCC 9484 (nessun cambiamento), *A. faecalis* ATCC 35655 (reazione alcalina, colore blu) *P. aeruginosa* ATCC 27853 (peptonizzazione, schiarimento).

13 – LIMITE DEL METODO

- Una formazione di coaguli deve essere registrata semplicemente come "coagulo". La differenziazione tra coagulo e cagliata non è utile.
- Le reazioni osservate nel Litmus Milk non sono sufficienti per la specializzazione; è necessario eseguire ulteriori test biochimici e sierologici.

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 +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 MacFaddin, il terreno di coltura può essere conservato in provette con tappo a vite a +2°C /+8°C per 2-4 settimane¹.

16 – BIBLIOGRAFIA

1. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
2. Cowan ST. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 3rd edition, edited and revised by Barrow GI and Feltham RKA. Cambridge University Press, 1993.



TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023

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

