



# MANNITOL SALT BROTH

Terreno di coltura in polvere

## 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido selettivo per la rilevazione e la differenziazione degli stafilococchi.

## 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \*

### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA \*

Peptocomplex	10,000 g
Estratto di carne	1,000 g
Sodio cloruro	75,000 g
Mannitolo	10,000 g
Rosso fenolo	0,025 g

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

## 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Mannitol Salt Broth si basa sui primi lavori di Gordon<sup>1</sup> che indicavano che la fermentazione del mannitolo poteva essere utilizzata come mezzo per differenziare gli stafilococchi patogeni da quelli non patogeni, e sulla scoperta di Koch<sup>2</sup> che la presenza del 7,5% di cloruro di sodio nei terreni di coltura inibiva la crescita della maggior parte degli organismi tranne gli stafilococchi. Chapman<sup>3</sup> utilizzò queste informazioni per formulare un terreno di coltura a base di mannitolo e rosso fenolo con il 7,5% di cloruro di sodio.

Il Mannitol Salt Broth è un terreno selettivo e differenziale destinato all'arricchimento degli stafilococchi e al loro conteggio mediante tecniche MPN o MF.

I peptoni forniscono carbonio, azoto e oligoelementi per la crescita batterica, mentre il cloruro di sodio alla concentrazione di 75 g/L crea un'elevata pressione osmotica: gli stafilococchi sono in grado di sopportare la pressione, mentre questa concentrazione inibisce la crescita della maggior parte degli altri batteri gram-positivi e gram-negativi<sup>2</sup>. Inoltre, il terreno contiene mannitolo come carboidrato fermentabile e rosso fenolo come indicatore di pH. Quando il mannitolo viene fermentato si produce acido, che abbassa il pH e determina la formazione di un colore giallo. I non fermentatori di mannitolo che resistono all'alta concentrazione di sale, mostrano un colore rosso-rosa dovuto alla degradazione del peptone<sup>4</sup>.

## 4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 96 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Mescolare accuratamente e riscaldare per sciogliere completamente la polvere. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

## 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, arancio
Aspetto della soluzione	rosso-arancio, limpida
pH finale (20-25 °C)	7,4 ± 0,2

## 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Mannitol Salt Broth	Terreno di coltura in polvere	4016662	500 g (5,2 L)

## 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, piastre di Petri, provette con tappo a vite, beute, tamponi assorbenti, filtri a membrana, terreni di coltura ausiliari e reagenti per l'identificazione delle colonie.

## 8 – CAMPIONI

Prodotti alimentari e altri materiali di importanza sanitaria. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

## 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Versare 1 mL di campione in una provetta da 9 mL o 10 mL in un flacone da 90 mL. In alternativa, versare 2 mL su un tampone assorbente posto in una piastra di Petri da 55 mm di diametro e quindi posizionare la membrana utilizzata per la filtrazione del campione.

Incubare a 37 °C per 24-48 ore

## 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica: le provette gialle contengono presumibilmente *S. aureus*, le provette torbide non gialle contengono presumibilmente altri stafilococchi.

Con la filtrazione a membrana, si presume che le colonie gialle siano *S. aureus* e quelle rosse altri stafilococchi.

Confermare gli isolati con il test della coagulasi o il test di agglutinazione al lattice.

## 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore 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>S. aureus</i> ATCC 6538 or 25923	37°C / 18-24 H / A	crescita, terreno vira al giallo
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	37°C / 18-24 H / A	crescita, Nessun cambiamento di colore del terreno
<i>E. coli</i> ATCC 8739	37°C / 24-48 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 per ogni lotto di Mannitol Salt Broth disidratato viene sottoposto a test di produttività e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.





La produttività e la specificità vengono testate inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di stafilococchi coagulasi positivi e coagulasi negativi in provette, incubando a 37°C per 36 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento ( $G_{r_{RB}}$ ) e nel lotto di prova ( $G_{r_{TB}}$ ). *S. aureus* ATCC 25923 mostra una buona crescita e le provette diventano gialle; *S. epidermidis* ATCC 12228 mostra una buona crescita senza cambiamenti di colore del terreno. L'indice di produttività  $G_{r_{RB}}/G_{r_{TB}}$  per ciascun ceppo in esame deve essere  $\leq 1$ . La selettività è testata con i seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922 e *P. vulgaris* ATCC 9484. Dopo incubazione a 37°C per 36 ore, la crescita dei ceppi non target è parzialmente inibita.

### 13 – LIMITE DEL METODO

- Gli enterococchi possono presentare crescita e leggera fermentazione del mannitolo; tuttavia, il test della catalasi e la morfologia Gram dovrebbero separare i due generi.<sup>5</sup>
- Alcuni ceppi di *S. aureus* possono presentare una fermentazione ritardata del mannitolo; le provette negative devono essere reincubate per altre 24 ore prima di essere scartate.<sup>5</sup>
- Il Mannitol Salt Broth è un terreno selettivo, tuttavia, se incubato per 48 ore, *Micrococcus* e *Bacillus* e alcuni ceppi di *Serratia* possono crescere.<sup>5</sup>
- È stato segnalato che alcuni stafilococchi coagulasi negativi possono acidificare il terreno di coltura.<sup>6</sup>
- Alcuni organismi target (ceppi di *Staphylococcus* potenzialmente patogeni) possono essere inibiti su questo terreno. La sensibilità della procedura descritta varia a seconda dei campioni, della quantità di organismi non target competitivi e del numero di organismi target.

### 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](http://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](http://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).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. Gordon, M. H. 1903-04. Reports of some characters by which various streptococci and staphylococci may be differentiated and identified. Local British Government Board, Rept. Med. Officer. 33:388-430.
2. Koch, F. E. 1942. Electivnährboden für Staphylokokken. Zentr. Bakt. Parasitenk. I Orig.149:122-124.
3. Chapman, G. H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J.Bacteriol. 50:201-203.
4. Shields P, Tsang AY. Mannitol salt agar plates protocol. American Society for Microbiology (ASM), October 9, 2006.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
6. Thakur P, Nayyar C, Tak V, Karnika Saigal K. Mannitol-fermenting and tube coagulase-negative staphylococcal isolates: unraveling the diagnostic dilemma. J Lab Physicians 2017; 9(1):65-66.

### 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 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023

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

