

## MRS AGAR ISO FORMULATION

Terreno di coltura in polvere

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio dei batteri lattici mesofili vitali negli alimenti e nei mangimi per animali

### 2 – COMPOSIZIONE

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

Digerito enzimatico di caseina	10,00 g
Estratto di carne	10,00 g
Estratto di lievito	4,00 g
Glucosio	20,00 g
Potassio fosfato bibasico	2,00 g
Sodio acetato	5,00 g
Triammonio citrato	2,00 g
Magnesio solfato eptaidrato	0,20 g
Manganese solfato tetraidrato	0,05 g
Agar	13,00 g
Tween® 80	1,08 g

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il gruppo dei cosiddetti "batteri lattici" (LAB) produce acido lattico come principale prodotto metabolico finale della fermentazione dei carboidrati. La produzione di acido lattico ha messo in relazione i LAB con le fermentazioni alimentari, poiché l'acidificazione inibisce la crescita degli agenti di deterioramento. I generi che compongono i LAB sono principalmente *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, oltre ad altri generi più rari.

MRS Agar è un terreno di coltura ideato da DeMan, Rogosa e Sharpe<sup>1</sup> nel 1960 principalmente per la coltivazione di lattobacilli provenienti da fonti orali, fecali, casearie e di altro tipo, con l'intento di produrre un terreno sostituito dell'agar al succo di pomodoro. Il terreno ha una buona produttività per quasi tutti i LAB, ma non è selettivo nella versione originale.<sup>2</sup> Diventa selettivo per i LAB se il pH viene abbassato a 5,7 e viene aggiunto acido sorbico in concentrazione dello 0,14%.<sup>2</sup>

MRS Agar ISO Formulation è preparato secondo la formulazione specificata dalla norma ISO 15124<sup>3</sup> a pH 5,7 per il conteggio di batteri lattici mesofili vitali. Se c'è il rischio di una contaminazione estesa da lieviti (ad esempio, nelle salsicce essiccate), la norma ISO raccomanda l'aggiunta di acido sorbico.

I peptoni forniscono azoto e minerali per la crescita microbica; l'estratto di lievito è una fonte di complesso di vitamine B per la stimolazione della crescita. Il Tween® 80 fornisce gli acidi grassi necessari al metabolismo dei lattobacilli, mentre il solfato di magnesio e il solfato di manganese forniscono ioni essenziali per la moltiplicazione dei lattobacilli. Il glucosio è il carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia per la crescita microbica. Il fosfato dipotassico tampona il terreno di coltura. La selettività è garantita dalla presenza di citrato di ammonio e acetato di sodio che, a basso pH, consentono la crescita dei LAB mentre inibiscono una serie di altri gruppi di microrganismi.

MRS Agar ISO Formulation si differenzia da MRS Agar con Tween 80 (REF 401728) per la presenza di tri-ammonio citrato anziché diammonio citrato e per il pH finale.

### 4 - PREPARAZIONE

Sospendere 67,3 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione agitando frequentemente per sciogliere completamente il prodotto. Distribuire in bottiglie di capacità adeguata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

Se necessario, aggiungere acido sorbico: sciogliere 1,4 g di acido sorbico in circa 10 mL di soluzione 1 mol/L di idrossido di sodio e sterilizzare per filtrazione. Aggiungere questa soluzione a 1000 mL di MRS Agar ISO Formulation, precedentemente raffreddato a circa 47°C. Il pH finale del terreno di coltura deve essere mantenuto a 5,7 ± 0,1 a 25°C.

### 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallastra
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	giallo, limpido o leggermente opalescente
pH finale (20-25 °C)	5,7 ± 0,1

### 6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
MRS Agar ISO Formulation	Terreno in polvere	401728S2	500 g (7,4 L)

### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre Petri sterili, acido sorbico, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

### 8 – CAMPIONI

Campioni alimentari. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Per il conteggio dei batteri lattici mesofili negli alimenti, la norma ISO 15214 raccomanda la seguente tecnica<sup>3</sup>:

1. Preparare il campione da analizzare, la sospensione iniziale e le diluizioni, in conformità alla norma internazionale specifica per il prodotto in questione.
2. Trasferire con pipette sterili 1 mL del campione da analizzare (se liquido) o 1 mL della sospensione iniziale e 1 mL di ciascuna diluizione decimale in duplice copia al centro di ciascuna piastra Petri vuota.





3. Versare circa 15 mL di MRS Agar ISO Formulation, raffreddato a circa 47°C in ogni piastra.
4. Mescolare bene l'inoculo con il terreno e lasciare che la miscela si solidifichi.
5. Capovolgere le piastre preparate e incubare a 30°C per 72 h ± 3 h.

Al posto della procedura di coltura descritta, è possibile eseguire un conteggio in superficie in combinazione con un'incubazione in condizioni anaerobiche o di microaerofilia. È anche possibile utilizzare il terreno MRS a doppio strato.

Secondo la norma ISO 20128 (IDF 102)<sup>4</sup>, *L. acidophilus* nello yogurt deve essere dosato con MRS Agar ISO Formulation con il pH modificato a 6,2 e integrato con clindamicina e ciprofloxacina. Trasferire 0,1 mL della/e diluizione/i appropriata/e sulla superficie di due piastre Petri contenenti il terreno di coltura. Distribuire il campione sull'intera superficie del terreno e incubare in anaerobiosi a 37 °C per 72 ore ± 3 ore.

### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare ogni specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

I lattobacilli crescono con colonie lenticolari, spesso di forma appuntita, di diametro compreso tra 1 mm e 3 mm, inserite in o su MRS Agar. Contare le piastre contenenti da 15 a 300 UFC.

### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità che ne verificare la conformità alle specifiche.

Tuttavia, è facoltà l'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.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L. sakei</i> ATCC 15521	30° / 72 H-A	crescita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	30° / 72 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, un campione rappresentativo per ogni lotto di terreno in polvere MRS Agar ISO Formulation (TB: lotto testato) viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato (RB)

La produttività è testata con un metodo quantitativo con i ceppi target *L. sakei* ATCC 15521, *P. pentosaceus* ATCC 33316, *L. lactis* ATCC 19435. Le piastre vengono inoculate con la tecnica dell'inclusione con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 72 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC<sub>TB</sub>/UFC<sub>RB</sub>). Se Pr è ≥ 0,7 e se la morfologia e le dimensioni delle colonie sono tipiche, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività viene valutata con il metodo semiquantitativo Miles-Misra modificato inoculando la superficie delle piastre con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922 e *B. cereus* ATCC 11778. La crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

### 13 – LIMITI DEL METODO

- Alcuni *Leuconostoc* spp. possono formare grandi colonie viscidose, che possono ostacolare lo sviluppo di altre colonie, causando così una sottostima del numero di batteri lattici.<sup>3</sup>
- A causa del possibile sviluppo di microrganismi diversi dai batteri lattici, in alcuni casi e per alcuni prodotti può essere necessario confermare le colonie con tecniche semplici (come la colorazione di Gram o il test della catalasi).<sup>3</sup>
- Se c'è il rischio di un'estesa contaminazione da lieviti (ad esempio, nelle salsicce essiccate), aggiungere acido sorbico al terreno di coltura.<sup>3</sup>
- Non lasciare che le piastre si asciughino; con l'essiccazione, la concentrazione di acetato aumenta in superficie, inibendo la crescita dei lattobacilli.<sup>4</sup>

### 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda 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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 del prodotto, 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

Al ricevimento, conservare a +2°C /+8°C al riparo dalla luce diretta in un luogo asciutto. Se conservato correttamente, il terreno può essere utilizzato fino alla data di scadenza. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in luoghi umidi. Dopo l'uso, il contenitore deve essere ben chiuso. Scartare il prodotto se il contenitore e/o il tappo sono danneggiati, o se il contenitore non è ben chiuso, o in caso di evidente deterioramento della polvere (cambiamenti di colore, indurimento, grossi grumi).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre/flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio). Secondo Baird RM et al. il terreno preparato senza acido sorbico può essere conservato a 2-8°C per 14 giorni, mentre con l'acido sorbico il tempo di conservazione è di 7 giorni a 2-8°C.<sup>2</sup> Secondo la norma ISO 20128, MRS Agar senza integrazioni preparato in flaconi può essere conservato al buio a 1 °C - 5 °C per 6 mesi.<sup>4</sup>

### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. DeMan JC, Rogosa M, Sharpe ME. (1960). An improved medium for the cultivation of Lactobacilli. 1960; J Appl Bact 23,130-135.
2. 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; 5:228-232.
3. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C.
4. ISO 20128 (IDF 192: 2006. Milk products — Enumeration of presumptive Lactobacillus acidophilus on a selective medium — Colony-count technique at 37 °C.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

®Tween è un marchio di ICI Americas Inc.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

### 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.

