



MULLER KAUFFMANN TETRATHIONATE BROTH BASE ISO FORMULATION

NOVOBIOCIN MKTT ANTIMICROBIC SUPPLEMENT IODINE SOLUTION

MK TETRATHIONATE NOVOBIOCIN BROTH

Terreno di coltura in polvere, supplemento selettivo e
terreno pronto all'uso in provetta

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido selettivo e supplementi per l'arricchimento di *Salmonella* da alimenti e mangimi.

2 – COMPOSIZIONE

TERRENO DISIDRATATO

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Digerito enzimatico di tessuto animale	4,30 g
Digerito enzimatico di caseina	8,60 g
Sodio cloruro	2,60 g
Carbonato di calcio	38,70 g
Sodio tiosolfato anidro	30,30 g [^]
Sali biliari	4,78 g
Verde brillante	9.60 mg

[^] equivalenti a 47,8 g Sodio tiosolfato pentaidrato

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

NOVOBIOCIN MKTT SELECTIVE SUPPLEMENT

CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO

Novobiocina	20 mg
-------------	-------

IODINE SOLUTION

CONTENUTO DELLA FIALA: 50 ML

Iodio	10.0 g
Potassio ioduro	12.5 g
Acqua distillata	50 mL

MK TETRATHIONATE NOVOBIOCIN BROTH

PROVETTE PRONTE ALL'USO

Muller Kauffmann Tetrathionate Broth Base	1000 mL
Novobiocina	40 mg
Iodine Solution	10 mL

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Muller Kauffmann Tetrathionate (MKTT) Broth è stato originariamente descritto da Muller¹ per l'isolamento delle salmonelle e successivamente modificato da Kauffmann² con l'inclusione di sali biliari e verde brillante come agenti selettivi per sopprimere batteri come *Proteus* spp. Jeffries³ ha proposto l'aggiunta di novobiocina 40 mg per litro per migliorare le proprietà selettive del terreno.

Il rilevamento di *Salmonella* negli alimenti richiede quattro fasi successive: pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo, arricchimento in due terreni liquidi selettivi, semina e riconoscimento, conferma.

Il terreno MKTT Broth Base con aggiunta di novobiocina e Iodine Solution è utilizzato per l'arricchimento selettivo di *Salmonella* da campioni della catena alimentare, insieme a RVS Broth o MSRV Agar, e soddisfa i requisiti della norma ISO 6579.⁴

I peptoni forniscono carbonio, azoto, vitamine e minerali per la crescita microbica; gli agenti selettivi del terreno sono sali biliari, verde brillante e tetrathionato di sodio che si forma dal tiosolfato di sodio quando la soluzione di iodio/ioduro di potassio viene aggiunta al terreno; il carbonato di calcio neutralizza l'acido solforico che si produce dalla riduzione del tetrathionato durante la crescita delle salmonelle, mantenendo il pH a valori neutri. La novobiocina è attiva principalmente contro i batteri Gram-positivi ma anche contro alcuni batteri Gram-negativi. Il terreno completo consente lo sviluppo delle salmonelle ed è inibitorio per i batteri Gram-positivi e per gran parte dei batteri Gram-negativi di origine enterica.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 44,6 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con frequente agitazione per sciogliere completamente la polvere. Evitare il surriscaldamento, non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere il contenuto di una fiala di Novobiocin MKK Antimicrobial Supplement (REF 4240047) ricostituita con 5 mL di acqua purificata sterile e 10 mL di Iodine Solution (ref.421501). Mescolare bene e dispensare 10 mL in provette sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, verde pallido
Aspetto della soluzione e del terreno in provetta	verde pallido con precipitati bianchi
Aspetto del supplemento Novobiocina liofilizzato	pastiglia bianca bassa e densa, dopo ricostituzione soluzione limpida incolore
pH (20-25 °C)	8,0 ± 0,2



**6 – MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Muller Kauffmann Tetrathionate Broth Base	Terreno in polvere	4017452	500 g (5,6 L)
		4017454	5 kg (56 L)
Novobiocin MKTT Selective Supplement	Supplemento disidratato	4240047	10 flaconi, ciascuno x 500 mL di terreno
Iodine Solution	Supplemento liquido	421501	50 mL
MK Tetrathionate Novobiocin Broth	Provette pronte all'uso	551745	20 x 10 mL

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Alimenti, mangimi, campioni della catena alimentare. 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 internazionali applicabili.^{3,4}

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Il seguente metodo è un riassunto tratto dalla norma ISO 6579.⁴

- Preparare il campione in conformità con lo standard internazionale specifico per il prodotto in questione. In generale, una certa quantità di campione viene aggiunta a una quantità di Buffered Peptone Water preriscaldata (REF 401278) tale da ottenere una diluizione 1:10 (ad esempio, 25 g di campione vengono miscelati con 225 mL di Buffered Peptone Water).
- Incubare tra 34 °C e 38 °C per 18 h ± 2 h.
- Trasferire 0,1 mL della coltura ottenuta in Buffered Peptone Water in una provetta contenente 10 mL di RVS Broth (REF 401981) o sulla superficie di una piastra di MSR/V Agar (REF 401982).
- Trasferire 1 mL della coltura ottenuta in Buffered Peptone Water in una provetta contenente 10 mL di Muller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (REF 401745 - MKTTn Broth).
- Incubare il RVS Broth inoculato (o le piastre di MSR/V Agar) a 41,5 °C ± 1 per 24 h ± 3 h.
- Incubare il brodo MKTTn inoculato tra 34 °C e 38 °C per 24 h ± 3 h.
- Dal RVS Broth o dal MSR/V Agar e dal MKTTn Broth trasferire un'ansa di crescita su una piastra di XLD Agar ISO Formulation e su un altro terreno selettivo per *Salmonella* basato su criteri diagnostici diversi da quelli dell'XLD agar (ad es. Chromogenic Salmonella Agar REF 405350). Su piastre di MSR/V Agar utilizzare un'ansa da 1 µL, su MKTTn Broth utilizzare un'ansa da 10 µL.
- Incubare la piastra di XLD Agar ISO Formulation capovolta tra 34 °C e 38 °C ed esaminarla dopo 24 ore. Incubare il secondo terreno selettivo in conformità alle istruzioni per l'uso.

NOTE

Dopo l'incubazione, è consentito conservare il campione pre-aricchito e l'arricchimento selettivo a 2-8 °C per un massimo di 72 ore.⁴

Nei prodotti lattiero-caseari in polvere e nel formaggio, la *Salmonella* può essere danneggiata in modo sub-letale. Incubare il terreno di arricchimento selettivo da questi prodotti per altre 24 ore ± 3 ore. Quando si esaminano campioni in corso di epidemia, può anche essere utile questo tempo di incubazione aggiuntivo.⁴

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la crescita degli organismi è indicata da torbidità e scolorimento.

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso dei terreni di coltura in piastra per la descrizione delle caratteristiche delle colonie di *Salmonella*.

Contrassegnare le colonie sospette su ogni piastra. Selezionare le colonie sospette per la subcoltura e la conferma.

I test di conferma biochimica includono: TSI Agar, Urea Agar, L-Lysine Decarboxylase Medium, rilevamento della β-galattosidasi (facoltativo), rilevamento dell'indolo (facoltativo).⁴ La conferma sierologica include il rilevamento della presenza di antigeni O e H di *Salmonella*.

La conferma biochimica può essere sostituita con il test rapido MUCAP (REF 191500). Tutte le colonie positive al test MUCAP devono essere confermate sierologicamente.

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi utili per il controllo qualità.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
S. Typhimurium ATCC 14028 + <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 + <i>E. coli</i> ATCC 25922	34-38°C / 24 h ± 3 h A	> 10 colonie tipiche dopo subcoltura su XLD Agar
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 <i>E. coli</i> ATCC 25922	34-38°C / 24 h ± 3 h A	< 100 colonie dopo subcoltura su TSA parzialmente inibito dopo subcoltura su TSA

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection;

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di MKTTn pronto all'uso e di MKTT Broth Base disidratato, addizionato con novobiocina e Iodine Solution, viene testato per la produttività e la selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di opportune diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 35-37°C per 24 ore, facendo una subcoltura su piastre di Tryptic Soy Agar e registrando la diluizione più elevata che mostra crescita nel lotto di riferimento (Gr_{RB}) e nel lotto testato (Gr_{TB}). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: S.Typhimurium ATCC 14208, S.Enteritidis ATCC 13076. L'indice di produttività Gr_{RB}-Gr_{TB} per ciascun ceppo di prova deve essere ≤ 1.





La produttività e la selettività sono testate contemporaneamente, con miscele di circa 100 UFC di organismi target e 1000 UFC di organismi non target per provetta, incubando a 35-37°C per 24 ore. Miscele di ceppi target e non target: *S. Typhimurium* ATCC 14028 +*E. coli* ATCC 25922 + *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione delle provette inoculate e la subcoltura su piastre di XLD Agar, i ceppi target mostreranno più di 10 colonie per piastra.

Inoltre, la selettività viene testata inoculando circa 10.000 UFC per provetta dei ceppi non target, incubando a 35-37°C per 24 ore e facendo una subcoltura su piastre di Tryptic Soy Agar. La selettività viene testata con i seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 2921. Le UFC di *E. coli* devono essere inferiori a 100 mentre le UFC di *E. faecalis* devono essere inferiori a 10 sulle piastre di Tryptic Soy Agar.

13 – LIMITI DEL METODO

- Il Muller Kauffmann Tetrathionate Broth non è adatto alla crescita di *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Sendai*, *S. Gallinarum*; ⁵
- Le colonie presunte di *Salmonella* devono essere sottoposte a sub-coltura e la loro identità deve essere confermata mediante appropriati test biochimici e sierologici.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed i supplementi qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi qui descritti sono classificati come pericolosi e 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Il supplemento Novobiocina è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Ogni provetta di questo terreno di coltura è monouso.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere, 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

Terreno di coltura in polvere

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).

Supplemento Novobiocina liofilizzato

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

Supplemento liquido: Iodine Solution

Al ricevimento, conservare il prodotto nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. Se conservato correttamente, il prodotto può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta; non utilizzare oltre questa data. Prima dell'uso, esaminare la soluzione e scartarla se ci sono evidenti segni di deterioramento (ad esempio, contaminazione, colore atipico o altre caratteristiche anomale).

Provette pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni le provette sono valide fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le provette estratte dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere usate immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare le provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anomale, colore atipico).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e controllo qualità dei terreni preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (provette/flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio). Secondo ISO 6579, il terreno di base può essere conservato in flaconi chiusi a 2-8 °C per un massimo di tre mesi. Se il terreno completo non viene utilizzato immediatamente, conservarlo al buio a 2-8 °C. Il pH può scendere durante la conservazione a causa di reazioni chimiche. Non utilizzare il terreno completo se il pH scende sotto 7,0.⁴

16- BIBLIOGRAFIA

1. Muller L. A nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique e des paratyphiques. C.R. Soc. Biol. (Paris) 1923; 89:434-443





2. Kauffmann F. Weitere Erfahrungen mit den kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen. Z Hyg Infektionskr. 1935; 117: 26-32
3. Jeffries L. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of Salmonellae from faeces. J Clin Pathol 1959; Nov;12(6):568-71.
4. ISO 6579-1:2017-2. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella —Part 1: Detection of Salmonella spp.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985..

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Proteggere dall'umidità	 Fragile, maneggiare con cura
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Lato superiore	 Proteggere dalla luce	 Non riutilizzare

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 7	Aggiornamento del contenuto e del layout	10/2024
Revisione 8	Correzione di errore nella formula	02/2025

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

