

**MODIFIED LAURYL SULFATE TRYPTOSE (mLST) BROTH BASE
ENTEROBACTER SAKAZAKII ISOLATION AGAR (ESIA)****Brodo d'arricchimento selettivo e terreno selettivo cromogeno
per la ricerca specifica di *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*****FORMULE TIPICHE****mLST BROTH BASE –POLVERE (g/L)**

Peptone*	20.00
Lattosio 5.00	Estratto di lievito
Potassio fosfato monobasico	2.75
Potassio fosfato Bibasico	2.75
Sodio lauril solfato	0.10
Sodio cloruro	34.00

* Digerito Enzimatico di tessuto animale e vegetale Agar

VANCOMYCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT (x fiala)

Vancomicina	25 mg
-------------	-------

mLST BROTH – PROVETTE (g/L)

Peptone*	20.00
Lattosio 5.00	
Potassio fosfato monobasico	2.75
Potassio fosfato bibasico	2.75
Sodio lauril solfato	0.10
Sodio cloruro	34.00
Vancomicina	0.01

* Digerito Enzimatico di tessuto animale e vegetale

ESIA - POLVERE E PIASTRE (g/L)

Peptone	7.00
3.00	
Sodio cloruro	5.00
Sodio desossicolato	0.60
Violetto cristallo	0.002
X- α -glucoside	0.150
15.00	

PREPARAZIONE DEI TERRENI IN POLVERE**Modified Lauryl Sul fate Tryptose (mLST) Broth Base**

Sospendere 64.6 g in 1000 ml di acqua distillata. Scaldare fino a completa soluzione. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente, quindi aggiungere 2 ml del contenuto di una fiala di Vancomycin Antimicrobic Supplement (REF 4240057) precedentemente ricostituito con 5 ml di acqua distillata sterile (il supplemento così ricostituito può essere conservato per 1 mese a – 20°C). Mescolare bene e distribuire in provette sterili da 10 ml con le cautele dell'asepsi.

pH finale 6.8 ± 0.2

Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)

Sospendere 30.8 g in 1000 ml di acqua distillata. Portare ad ebollizione sotto agitazione, autoclavare a 121°C per 15 minuti; raffreddare a 45-50°C e distribuire in piastre petri sterili

pH finale 7.0 ± 0.2

DESCRIZIONE

Cronobacter (Enterobacter) sakazakii è un bastoncino Gram negativo, riconosciuto nel 1980 dal microbiologo giapponese Riichi Sakazakii come variante pigmentata di giallo di *Enterobacter cloacae* e denominato in suo onore *Enterobacter sakazakii*.

Recenti studi di biologia molecolare (Carol Iversen et al.) hanno evidenziato che, riconducibili ad *E. sakazakii*, vi sono numerose genomspecie e gli autori hanno provveduto ad una loro riclassificazione all'interno del genere *Cronobacter* della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter sakazakii* è un patogeno opportunisto, coinvolto in meningiti, sepsi, enterocoliti necrotizzanti ed ascessi cerebrali in neonati immaturi o immunocompromessi con elevati tassi di mortalità. E' altresì responsabile di infezioni nosocomiali.

Le patologie sono state associate al consumo di preparati per neonati in polvere a base di latte o di soia, contaminati da *C. sakazakii*. Episodi di infezioni sono stati segnalati nelle unità di terapia intensiva neonatale in Canada, USA, UK, Grecia, Olanda.

mLST Broth è un brodo selettivo preparato in accordo alla norma ISO/TC 22964 che consente l'arricchimento nel campione dei bastoncini Gram negativi ed in particolare di *Cronobacter* spp.

Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA) è un terreno selettivo per Gram negativi preparato in accordo alla norma ISO/TC 22964 contenente un composto cromogenico per la differenziazione di *Cronobacter sakazakii* che coltiva con colonie blu.

L'impiego di Buffered Peptone Water come arricchimento non selettivo, di mLST Broth come arricchimento selettivo e del terreno d'isolamento ESIA, preparati in accordo alle formulazioni indicate dalla Norma ISO/TS 22964, consentono la ricerca specifica *C. sakazakii* nei campioni alimentari ed in particolare nel latte in polvere o in prodotti preparati con latte in polvere.

METODO D'IMPIEGO

Il metodo ISO/TC 22964 raccomanda la seguente procedura:

- Sospendere il campione in esame in Buffered Peptone Water (REF 401278) in rapporto 1:9 (es. 25 g di campione in 225 ml di BPW). Incubare a 37 ± 1°C per 18 ± 2 ore.
- Eseguire una subcultura di 0,1 ml dal brodo BPW in una provetta contenente 10 ml di mLST Broth Incubare a 44 ± 0,5°C per 24 ± 2 ore.
- Facendo uso di un'ansa trapiantare 10 µl dal brodo mLST su una piastra di ESIA ed incubare a 44 ± 1°C per 24 ± 2 ore.
- Esaminare le colonie con morfologia e colore caratteristico:
Risultato positivo presuntivo: presenza di colonie tipiche color blu, con diametro da 1 a 3 mm
Risultato negativo: assenza di colonie tipiche blu o presenza di colonie color malva (assenza di *C. sakazakii*)
- Confermare le colonie con i test biochimici raccomandati dalla norma ISO/TS 22964

Controllo qualità dell'utilizzatore (mLST Broth)Controllo della produttività*C.sakazakii* buona crescitaControllo della selettività*S.aureus* ATCC 25923: inibito

Incubazione a 44°C per 24 ore.

Controllo qualità dell'utilizzatore (ESIA)Controllo della produttività*C.sakazakii* buona crescita, colonie color bluControllo della specificità*Enterobacter gergovieae*: buona crescita, colonie color porporaControllo della selettività*S.aureus* ATCC 25923: inibito

Incubazione a 44°C per 24 ore.

CONSERVAZIONE

mLST Broth Base in polvere: conservare a 10-30°C

ESIA in polvere: conservare a 2-8°C

Conservare i terreni pronti in provetta ed in piastra fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2 - 8°C.

Eliminare se vi sono segni di deterioramento.

LIMITIAlcuni coliformi coltivano su ESIA con colonie violetto, facilmente distinguibili dalle colonie blu di *C.sakazakii*.**PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI**Il preparato mLST Broth Base qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni $\geq 1\%$.Il preparato ESIA qui descritto contiene sodio desossicolato in concentrazione $>1\%$: consultare la scheda di sicurezza prima dell'uso.

I prodotti qui descritti devono essere usati in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le provette e le piastre dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

BIBLIOGRAFIA

•Carol Iversen et al., BMC Evol Biol. 2007; 7: 64.

•ISO/TS 22694:2006 Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*•Simmons, B.P. et al. (1989) *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 10: 398.•Van Acker, J et. Al. (2001) Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *E.sakazakii* in powdered milk formula. J.Clin.Microbiol. 39:293-297.**CONFEZIONI****TERRENI IN POLVERE**

4014762	Modified Lauryl Sul fate Tryptose (mLST) Broth Base	500 g (7,8 L)
4014782	Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)	500 g (16,2 L)

SUPPLEMENTO

4240057	Vancomycin Antimicrobial Supplement	10 fiale, ciascuna per 2, 5 litri di terreno
----------------	--------------------------------------------	-----------------------------------------------------

TERRENI PRONTI PER L'USO

5514762	Modified Lauryl Sul fate (mLST) Broth	20x10 ml (provette pronte)
----------------	----------------------------------------------	-----------------------------------

541478	Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA)	20 piastre da 90 mm, confezionate in film e in scatola di cartone
---------------	-----------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------