

CLOSTRIDIUM AGAR

(Reinforced Clostridial Agar)

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la coltivazione e il conteggio dei clostridi e di altri anaerobi.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Estratto di lievito	3,0 g
Estratto di carne	10,0 g
Tryptone	10,0 g
Glucosio	5,0 g
Amido solubile	1,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio acetato	3,0 g
Cisteina HCl	0,5 g
Agar	15,0 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Reinforced Clostridial Medium è stato formulato da Hirsch e Grinstead nel 1954¹, mentre la versione solida del terreno (Clostridium Agar o Reinforced Clostridial Agar) corrisponde alla formulazione descritta da Barnes e Ingram.²

Clostridium Agar è molto ricco e viene utilizzato per la coltivazione e il conteggio di clostridi, lattobacilli e altri anaerobi e anaerobi facoltativi, negli alimenti e in altri materiali.³ Il peptone e l'estratto di carne forniscono azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B e il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico mentre l'acetato di sodio tampona il terreno. La L-cisteina, un agente riducente, favorisce la crescita degli anaerobi. L'amido solubile aiuta a disintossicare i sottoprodotti metabolici. L'agar è l'agente solidificante. Secondo Hirsch e Grinstead, è possibile aggiungere polimixina B 0,02 g/L per inibire i batteri Gram-negativi. Secondo APHA⁴, per il conteggio degli streptococchi lattici il terreno deve essere integrato con ulteriori 5 g/L di glucosio per arrivare a 10 g/L di glucosio per litro e il blu di prussia può essere incorporato nel terreno di base in ragione di 0,3 g/L secondo necessità.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 52,5 g in 1000 mL di acqua depurata fredda. Portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 115°C per 20 minuti. Se necessario, raffreddare a 45-50 °C e aggiungere 0,02 g/L di Polimixina B sotto forma di soluzione acquosa filtrata.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallo chiaro
Aspetto della soluzione	giallo chiaro, leggermente opalescente
pH finale (20-25 °C)	6,8 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Clostridium Agar	Terreno di coltura in polvere	4013032	500 g (9,5 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette, piastre di Petri, generatori di atmosfera controllata e giare, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Campioni di acque, alimentari e farmaceutici. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare le diluizioni decimali del campione e inoculare le provette o le piastre mediante la tecnica della semina per inclusione.

Da ogni diluizione prelevare un'aliquota e aggiungerla a piastre o provette. Versare il terreno sciolto a 45-50°C sul campione e lasciare solidificare.

Incubare 2-5 giorni a una temperatura ottimale (ad esempio, 35 °C). Un ambiente anaerobio può essere ottenuto nelle provette ricoprendole con olio subito dopo la solidificazione del terreno. Se si utilizzano piastre, queste devono essere incubate in atmosfera anaerobica.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le colonie dei batteri che crescono su Clostridium Agar presentano una colorazione giallastra opaca. La presenza di bastoncini con o senza endospore, negativi al test della catalasi indica la presenza di clostridi. Il risultato della coltura deve essere confermato dall'identificazione biochimica.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti del prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione dei test del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore 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 riportati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità del terreno di coltura.



CEPPI DI CONTROLLO
C. perfringens ATCC 13124
C. sporogenes ATCC 19404

INCUBAZIONE T°/ T - ATM
 30 or 35°C / 48h / AN
 30 or 35°C / 48h / AN

RISULTATI ATTESI
 crescita
 crescita

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 Clostridium Agar disidratato viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando diluizioni decimali di organismi nel terreno in provetta, incubando a 30°C per 48 ore in atmosfera anaerobica e registrando la diluizione più alta con crescita sia nel lotto di riferimento (G_{RB}) che nel lotto da testare (G_{TB}). La produttività è testata con i seguenti ceppi: *C. perfringens* ATCC 13124, *C. sporogenes* ATCC 19404, *C. bifermentans* NCTC 506. L'indice di produttività $G_{RB}-G_{TB}$ per ciascun ceppo di prova deve essere ≤ 1 .

13 -LIMITI DEL METODO

- Il terreno non è selettivo: anche altri anaerobi sporigeni come *C. butyricum*, lattobacilli e streptococchi mostrano una buona crescita.³
- Per una completa identificazione devono essere eseguiti opportuni test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa su isolati da coltura pura.

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 preparato può essere conservato a +2°C /+8°C fino a 2 settimane.³

16 - BIBLIOGRAFIA

- Hirsch A, Grinstead, E. Methods for the growth and enumeration of anaerobic sporeformers from cheese, with observations on the effect of nisin. J Dairy Res 1954; 21: 101-110.
- Barnes EM, Ingram M. The effect of redox potential on the grown Clostridium welchii strain isolated from horse muscle. J Appl Bact 1956; 19: 177-
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2023

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

