



## **CLOSTRIDIUM BROTH (Reinforced Clostridial Medium)**

**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
Peptone	10,0 g
Glucosio	5,0 g
Amido solubile	1,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio acetato	3,0 g
L-Cisteina HCl	0,5 g
Agar	0,5 g

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

### **3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO**

Il Clostridium Broth, formulato da Hirsch e Grinstead nel 1954,<sup>1</sup> è anche noto come Reinforced Clostridial Medium. È raccomandato dalla Farmacopea Europea<sup>2</sup> per l'arricchimento selettivo dei Clostridi da prodotti farmaceutici non sterili e conformi alle specifiche di prestazione degli standard USP/EP/JP armonizzati.

Clostridium Broth è il terreno di base per la preparazione del Differential Reinforced Clostridial Medium di Gibbs e Freame,<sup>3</sup> raccomandato da ISO 6461-1<sup>4</sup> per il rilevamento e il conteggio delle spore di anaerobi solfito-riduttori (clostridi) nelle acque.

Questo terreno è stato descritto per il rilevamento dei clostridi nei prodotti alimentari con il metodo Most Probable Number.<sup>5</sup>

Il terreno è molto ricco e consente la crescita della maggior parte dei clostridi e di molti altri anaerobi e anaerobi facoltativi. Il triptone e l'estratto di manzo forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi 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 il sodio acetato agisce da tampone. La L-cisteina, agente riducente, e l'agar a bassa concentrazione favoriscono la crescita degli anaerobi. L'amido solubile aiuta a liberare dai sottoprodotti metabolici. Il sodio solfito e il citrato ferrico vengono aggiunti al terreno e agiscono come indicatori: i clostridi solfito-riduttori producono solfuro dal solfito, il che si traduce nell'annerimento del terreno. Secondo Hirsch e Grinstead,<sup>1</sup> per inibire i batteri Gram-negativi può essere aggiunta polimixina B 0,02 g/L.

### **4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO**

Sospendere 38 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino a ebollizione con frequente agitazione, distribuire in flaconi con tappo a vite e sterilizzare in autoclave a 115 ° C per 20 minuti.

Per la preparazione del Differential Reinforced Clostridial Medium, preparare il Clostridium Broth a doppia concentrazione riducendo il volume dell'acqua di metà e trasferire aliquote da 10 mL e 50 mL in flaconi con tappo a vite con una capacità leggermente più del doppio. Preparare una soluzione al 4% di sodio solfito e una soluzione al 7% di citrato ferrico; se necessario, riscaldare la soluzione di citrato ferrico per 5 minuti perché si dissolva completamente. Sterilizzare le due soluzioni per filtrazione e conservare a +2/+5 ° C in bottiglie chiuse; le due soluzioni sono stabili per due settimane. Il giorno dell'analisi, mescolare volumi uguali delle due soluzioni e, in condizioni sterili, aggiungere 0,5 mL di reagente ad ogni 25 mL di terreno. Per la preparazione del Clostridium Broth a doppia concentrazione, aggiungere 0,4 mL della miscela in 10 mL di terreno e 2 mL in 50 mL di terreno.

Se necessario, aggiungere al terreno pre-raffreddato a 45-50°C, 0,02 g/L di polimixina B sotto forma di una soluzione acquosa sterilizzata per filtrazione.

### **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 Broth	Terreno di coltura in polvere	4013042	500 g (13,2 L)

### **7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI**

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

### **8 – CAMPIONI**

Campioni idrici, 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**

Per la determinazione dei Clostridi nei prodotti farmaceutici non sterili procedere come segue.<sup>2</sup>

- Preparare una diluizione 1:10 del campione in Farmacopeia Diluent (Rif. 401395), con un volume minimo di 20 mL, usando non meno di 2 g o 2 mL del campione da testare.
- Dividere questa diluizione in 2 aliquote di almeno 10 mL ciascuna. Scaldare un'aliquota a 80 ° C per 10 minuti e raffreddare rapidamente. Non riscaldare la seconda aliquota.





- Inoculare in Clostridium Broth 10 mL o la quantità corrispondente a 1 g o 1 mL di prodotto da esaminare, da ciascuna delle due aliquote.
- Incubare in condizioni anaerobiche a 30- 35 °C per 48 ore.
- Dopo l'incubazione eseguire sottocolture da ciascuna provetta/ffacone su agar Columbia e incubare in condizioni anaerobiche a 30-35 °C per 48-72 ore.
- La presenza di bastoncelli con o senza endospore che sono negativi al test della catalasi indica la presenza di Clostridi. Il risultato della coltura deve essere confermato dall'identificazione biochimica.
- Il test deve essere considerato negativo se non ci sono colonie con le caratteristiche sopra descritte nel campione o se i test di identificazione biochimica sono negativi.

### 10 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti del prodotto vengono messi in 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	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	35-37°C / 48h / AN	crescita
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	35-37°C / 48h / AN	crescita

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

### 11 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Clostridium Broth disidratato viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di organismi in provette. I ceppi vengono incubati (a 35-37°C secondo ISO 11133<sup>7</sup> o 30-35°C secondo EP) per 48 ore in atmosfera anaerobica e si registra la massima diluizione che mostra la crescita nel lotto di riferimento (GrRB) e nel lotto testato (GrTB). La produttività è testata con i seguenti ceppi: *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* ATCC 9689, *E. coli* ATCC 25922 secondo ISO 11133:2014 e *C. sporogenes* ATCC 19404 secondo EP. L'indice di produttività  $G_{GrTB}-G_{GrRB}$  per ciascun ceppo di prova deve essere  $\leq 1$ .

### 12 -LIMITI DEL METODO

- Bottiglie di vetro ermeticamente chiuse contenenti grossi volumi di coltura possono esplodere a causa della produzione di gas. Fare riferimento alla norma ISO 6461-1 o a test specifici per le precauzioni da adottare durante l'incubazione delle provette.<sup>4</sup>
- Il terreno non è selettivo: altri anaerobi sporiformi, come *C. butyricum*, lattobacilli e streptococchi mostrano una buona crescita.<sup>6</sup>
- Clostridium Broth addizionato con sodio solfito e citrato ferrico: altri batteri possono produrre solfuro, inoltre occorre pastorizzare per rimuovere le forme vegetative.<sup>6</sup>
- Per un'identificazione completa è necessario eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, a partire da colture pure.

### 13 - 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).

Secondo MacFaddin, il terreno preparato in laboratorio può essere conservato a +2°C /+8°C fino a 2 settimane.<sup>6</sup>










### 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.



2. European Pharmacopoeia 11th Edition, 2022, Vol. 1; 2.6.13 Microbiological Examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms: 01/2021:20631.
3. Gibbs BM, Freame B. Methods for the recovery of clostridia from foods. J Appl Bacteriol 1965; 28:95-111.
4. ISO 6461-1:1986 Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) — Part 1: Method by enrichment in a liquid medium.
5. Mead GC. Principles involved in the detection and enumeration of clostridia in foods. Int J Food Microbiol 1992; 17:135-43.
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

 <b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b> Numero di catalogo	 <b>LOT</b> 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 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2023

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

