



# CLOSTRIDIUM PERFRINGENS AGAR BASE KANAMYCIN POLYMYXIN B ANTIMICROBIC SUPPLEMENT D-CYCLOSERINE ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

## Terreno di coltura in polvere e supplementi selettivi

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento e il conteggio di *Clostridium perfringens* da alimenti, acque e altri materiali.

### 2 – COMPOSIZIONE

#### CLOSTRIDIUM PERFRINGENS AGAR BASE

##### FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN 1L DI ACQUA\*

Triptosio	15 g
Estratto di carne	5 g
Peptone di soia	5 g
Estratto di lievito	5 g
Ferro ammonio citrato	1 g
Sodio metabisolfito	1 g
Agar	13 g

#### KANAMYCIN POLYMYXIN B ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

##### (FLACONE PER 500 mL DI TERRENO)

Kanamicina	6 mg
Polimixina B	15.000 U.I.

#### D-CYCLOSERINE ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

##### (FLACONE PER 500 mL DI TERRENO)

D-cicloserina	200 mg
---------------	--------

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'intossicazione alimentare causata da *Clostridium perfringens* può verificarsi quando alimenti come carni crude, pollame, zuppe e salse disidratate, verdure crude e spezie vengono cotti e conservati senza mantenere un adeguato riscaldamento o refrigerazione prima di essere serviti.<sup>1</sup> Il conteggio di *C. perfringens* in campioni di alimenti svolge un ruolo fondamentale nell'indagine epidemiologica dei focolai di malattie di origine alimentare e a questo scopo sono stati proposti diversi terreni di coltura fin dagli anni Cinquanta.

Clostridium Perfringens Agar Base è preparato secondo una modifica dello Shahidi-Ferguson-perfringens (SFP) agar<sup>2</sup> con l'aggiunta di 5 g/L di estratto di carne alla formulazione originale e corrisponde alla formulazione descritta da USDA-FSIS.<sup>4</sup>

Per l'isolamento e il conteggio di *C. perfringens* negli alimenti, i metodi più comuni in Europa continentale e in Nord America sono quelli che utilizzano il terreno di Harmon et al. (Tryptose Sulfite Cycloserine - TSC - Agar)<sup>5</sup> o il terreno di Shahidi-Ferguson<sup>2</sup> con kanamicina e polimixina B (SFP Agar), che hanno sostituito i terreni di Angelotti (Sulfite Polymyxin Sulphadiazine Agar) e Marshall (Tryptone Sulfite Neomycin Agar), risultati inibitori per alcuni ceppi di *C. perfringens*.<sup>2</sup>

Il TSC Egg Yolk Agar viene preparato aggiungendo al Clostridium Perfringens Agar Base, 400 mg/L di D-cicloserina e l'arricchimento di emulsione di tuorlo d'uovo. Il terreno Shahidi e Ferguson Perfringens (SFP) è preparato aggiungendo al terreno di base kanamicina e polimixina B e l'arricchimento di emulsione di tuorlo d'uovo.

Il triptosio, l'estratto di carne e il peptone di soia forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il ferro ammonio citrato e il sodio metabisolfito sono indicatori della riduzione del solfito da parte di *C. perfringens*, che produce colonie nere. Il tuorlo d'uovo è il substrato per rilevare l'attività della lecitinasi. La D-cicloserina o la miscela di kanamicina e polimixina contribuiscono all'isolamento selettivo di *C. perfringens* inibendo la flora contaminante.

### 4 – PREPARAZIONE

**SFP Agar<sup>2</sup>:** sospendere 22,5 g in 450 mL di acqua fredda purificata, riscaldare fino ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere 50 mL di Egg Yolk Emulsion (REF 42111601) e il contenuto di una fiala di Kanamycin Polymyxin B Antimicrobial Supplement (REF 4240005), ricostituito con 5 mL di acqua distillata sterile. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

**TSC Egg Yolk Agar<sup>4</sup>:** sospendere 22,5 g in 475 mL di acqua fredda purificata, riscaldare fino ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere 25 mL di Egg Yolk Emulsion (REF 42111601) e il contenuto di una fiala di D-Cycloserine Antimicrobial Supplement (REF 4240002), ricostituito con 5 mL di acqua depurata sterile. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

**TSC Agar e SFP Agar senza Egg Yolk Emulsion:** preparare i terreni come descritto sopra, omettendo l'aggiunta dell' Egg Yolk Emulsion e pesando 22,5 g in 500 mL di acqua.

### 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

#### Clostridium Perfringens Agar Base

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	giallo, limpido
pH finale a 20-25 °C	7.6 ± 0.2



**D-Cycloserine Antimicrobial Supplement**

Aspetto del supplemento liofilizzato

pastiglia bassa, bianca e compatta

Aspetto del supplemento ricostituito

incolore, limpido

**Kanamycin Polymyxin B Antimicrobial Supplement**

Aspetto del supplemento liofilizzato

pastiglia bassa, bianca e compatta

Aspetto del supplemento ricostituito

incolore, limpido

**6 – MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Clostridium Perfringens Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4013072	500 g (11,1 L)
Kanamycin Polymyxin B Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240005	10 fiale, ciascuno per 500 mL di terreno
D-Cycloserine Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240002	10 fiale, ciascuno per 500 mL di terreno

**7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI**

Autoclave, bagnomaria, anse sterili, tamponi e pipette, incubatore e attrezzature di laboratorio come richiesto, beute, piastre Petri sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, mezzi di coltura e reagenti ausiliari.

**8 – CAMPIONI**

Alimenti e mangimi per animali. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

**9 – PROCEDURA D'ANALISI**

Il conteggio presuntivo di *C. perfringens* viene eseguito distribuendo il campione su TSC Agar o su SFP Agar con Egg Yolk e aggiungendo un secondo strato di terreno senza Egg Yolk sopra lo strato inoculato.

Inoculare le piastre con 0,1 mL della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali del campione preparato, distribuendoli sulla superficie uniformemente. Lasciare asciugare 5-10 minuti.

Coprire lo strato inoculato con 10 mL di terreno preparato senza Egg Yolk. Lasciare solidificare.

Incubare le piastre per 20-24 ore a 37°C in atmosfera anaerobica (5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>).

**10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DELL'ANALISI**

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Per il conteggio di *C. perfringens* scegliere piastre contenenti da 20 a 200 colonie tipiche.

*C. perfringens* solitamente coltiva con colonie nere o grigio-giallo-brune come risultato della riduzione del solfito a solfuro che reagisce con un sale ferrico nel terreno di coltura, circondate da un alone opaco di precipitazione di tuorlo d'uovo.

**11 – CONTROLLO QUALITÀ**

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 ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	37°C/ 18-24 H / AN	crescita, colonie nere circondate alone opaco
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C/ 18-24 H / AN	totalmente inibito

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

**12 – VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI**

Prima dell'immissione sul mercato, un campione rappresentativo di tutti i lotti del terreno in polvere Clostridium Perfringens Agar Base supplementato con Egg Yolk 50% Emulsion e con o senza D-Cycloserine Antimicrobial Supplement (Test Batch:TB), viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato (Reference Batch: RB).

Le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica quantitativa con i seguenti ceppi target *C. perfringens* ATCC 13124 e ATCC 12916, incubando a 37°C per 20 ore in atmosfera anaerobica. 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 il colore delle colonie sono tipici (colonie nere con alone opaco), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività è testata con il metodo Miles-Misra modificato con i seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 10005 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione *E. coli* è totalmente inibito, mentre *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* sono parzialmente inibiti. Clostridium Perfringens Agar Base senza D-cicloserina è stato testato tramite metodo ecometrico con *E. coli* ATCC 25922 che ha mostrato una buona crescita.

**13-LIMITI DEL METODO**

- Le colonie di *C. perfringens* possono produrre una zona opaca nel terreno circostante a causa dell'attività della lecitinasi, anche se questa non è una caratteristica distintiva di tutti i ceppi di *C. perfringens* dopo l'incubazione overnight. Sia le colonie nere lecitinasi-positiva che quelle lecitinasi-negative devono essere testate per conferma.<sup>6</sup>
- Gli anaerobi facoltativi positivi alla lecitinasi possono crescere su SFP Agar producendo piastre completamente opache che mascherano la reazione di *C. perfringens* con l'Egg Yolk.
- Le colonie nere devono essere confermate come *C. perfringens* mediante test appropriati: motilità (-), riduzione dei nitrati (+), acido e gas del lattosio (+), liquefazione della gelatina (+).



#### 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.
- Il terreno disidratato ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Clostridium Perfringens Agar Base è classificato come pericoloso secondo la normativa vigente. 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- I supplementi sono sterilizzati mediante filtrazione a membrana.
- 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](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

##### 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 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).

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).

In accordo alla ISO 14189<sup>7</sup> le piastre con D-cicloserina possono essere conservate ad una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 7 giorni; il terreno di base (senza D-cicloserina) può essere conservato a 2-8°C ed utilizzate entro 4 settimane dalla preparazione.

#### 16 - BIBLIOGRAFIA

- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 16: Clostridium perfringens.
- Shahidi SA, Ferguson AR. New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 1971; 21:500-506.
- Atlas R. Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition. CRC Press, 1997
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. Laboratory Guidebook Notice of Change. MLG Appendix 1.10. Effective Date: 03/07/22.
- Harmon SM, Kautter DA, Peeler JT. Improved medium for enumeration of Clostridium perfringens. Appl Microbiol 1971; 22:688-92.
- Hauschild AH, Hilsheimer R. Evaluation and modifications of media for enumeration of Clostridium perfringens. Appl Microbiol 1974; 27:78-82.
- ISO 14189:2013 Water quality — Enumeration of Clostridium perfringens — Method using membrane filtration

#### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

#### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizioni delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2023

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