



# DIFFERENTIAL CLOSTRIDIAL AGAR

## Terreno di coltura in polvere

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno basico a cui vengono aggiunte soluzioni di citrato di ferro (III) e di solfito di sodio, per il conteggio di spore di clostridi solfito-riduttori in alimenti essiccati.

### 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \*

#### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA \*

Digerito pancreatico di caseina	5,00 g
Digerito enzimatico di carne	5,00 g
Estratto di carne	8,00 g
Estratto di lievito	1,00 g
Amido	1,00 g
D (+) Glucosio	1,00 g
L-cisteina HCl	0,50 g
Resazurina	0,002 g
Agar	20,00 g

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Differential Clostridial Agar è stato formulato da Weenk et al.<sup>1</sup> per il conteggio delle spore di clostridi mesofili negli alimenti secchi. Essi hanno stabilito che l'attività del solfito e lo ione ferroso devono essere rigorosamente standardizzati e che il terreno di coltura deve essere privo di acetato e lattato. Il Differential Clostridial Agar è stato incluso dall'APHA<sup>2</sup> nell'elenco dei terreni comunemente utilizzati per l'isolamento e il conteggio dei clostridi negli alimenti.

Il terreno è molto ricco e consente la crescita della maggior parte dei clostridi e di molti altri anaerobi e anaerobi facoltativi. Il digerito pancreatico di caseina, il digerito enzimatico di carne e l'estratto di carne forniscono azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B, mentre il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. La L-cisteina è un agente riducente e favorisce la crescita degli anaerobi. L'amido aiuta a eliminare i sottoprodotti metabolici. Il solfito di sodio e il citrato ferrico vengono aggiunti al terreno di coltura e fungono da indicatori: i clostridi solfito-riduttori producono solfuro dal solfito, con conseguente formazione di una colorazione nera. L'indicatore redox resazurin viene utilizzato per monitorare l'anaerobiosi. L'agar è l'agente solidificante.

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

Sospendere 41,5 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 45-48°C e aggiungere 5 mL di soluzione A e 1 mL di soluzione B.

Soluzione A (preparata al momento): 1 g di citrato ferrico (III) di ammonio in 5 mL di acqua depurata, sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti o sterilizzata per filtrazione.

Soluzione B: 2,5 g di solfito di sodio anidro in 10 mL di acqua depurata, sterilizzata per filtrazione. Può essere conservata per non più di un mese.

### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, grigia
Aspetto della soluzione	giallo, limpida o leggermente opalescente
pH finale (20-25 °C)	7,6 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Differential Clostridial Agar	Terreno di coltura in polvere	4013122	500 g (12 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, citrato ferrico (III) di ammonio, solfito di sodio, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

### 8 – CAMPIONI

Prodotti alimentari. 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.<sup>2</sup>

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare i campioni o i campioni riscaldati e le diluizioni e inoculare due piastre Petri con 1 mL di ciascuna delle diluizioni appropriate del materiale alimentare.

Versare 15 mL di terreno sciolto e mescolare bene l'inoculo con il terreno.

Lasciare solidificare il terreno e ricoprire le piastre con uno strato dello stesso terreno.

Incubare per 2-5 giorni a 30-35 °C in condizioni anaerobiche.

Weenk et al. hanno sviluppato una procedura alternativa utilizzando una semina a spirale con Differential Clostridial Agar e uno strato di DCA sovrapposto.<sup>1,2</sup>

### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I clostridi riducono il solfito a solfuro e il solfuro di ferro prodotto fa diventare nero il terreno di coltura.

Contare le colonie nere sulle piastre contenenti da 15 a 150 colonie caratteristiche.

### 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	INCUBAZIONE T° / T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	30 °C / 72h / AN	crescita con colonie nere
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404	30 °C / 72h / AN	crescita con colonie nere

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 Differential Clostridial Agar disidratato addizionato con soluzioni di solfito di sodio e citrato di ammonio ferrico (Lotto di prova TB) viene valutato per la produttività e la specificità confrontando i risultati con un Lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività viene testata con un metodo quantitativo su piastra con i ceppi target *C. perfringens* ATCC 13124, *C. bifermentans* NCTC 506, *C. sporogenes* ATCC 1904. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 72 ore. 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 aloni neri), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. La specificità viene testata con il metodo quantitativo su piastra con il ceppo non target *B. subtilis* ATCC 6633. Dopo incubazione a 30°C per 72 ore, il ceppo non target mostra una buona crescita con colonie incolore.

### 13 -LIMITI DEL METODO

- Alcuni bacilli potrebbero imitare i clostridi sotto tale procedura.<sup>1</sup>
- Per una completa identificazione è necessario eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, a partire da colture pure.

### 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](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).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

- Weenk GH, Van den Brink JA, Struijk CB, Mossel DA. Modified methods for the enumeration of spores of mesophilic Clostridium species in dried foods. *Int J Food Microbiol* 27(2-3):185-200.
- 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 Numero di lotto	Utilizzare entro	Fabbricante	
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente <n> test per	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 1	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2023

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