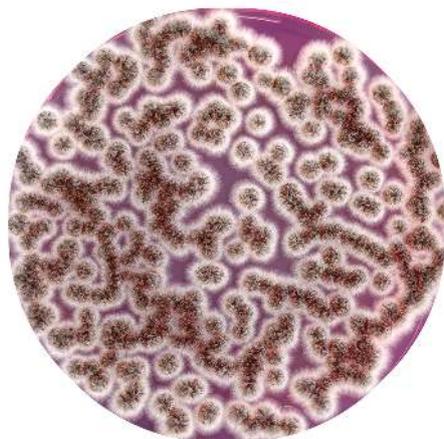




DRBC CHLORAMPHENICOL AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso



DRBC Agar: *Aspergillus brasiliensis*

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno di coltura completo di cloramfenicolo per il conteggio di lieviti e muffe in alimenti e mangimi con attività dell'acqua superiore a 0,95 (ISO 21527-1)

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

TERRENO DISIDRATATO E PIASTRE PRONTE PER L'USO

| | |
|---|---------|
| Digerito enzimatico di tessuti animali e vegetali | 5 g |
| D-Glucosio (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 10 g |
| Potassio diidrogenofosfato (KH ₂ PO ₄) | 1 g |
| Magnesio solfato (MgSO ₄ .H ₂ O) | 0,5 g |
| Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilina) | 0,002 g |
| Rosa bengala | 0,025 g |
| Cloramfenicolo | 0,1 g |
| Agar | 15 g |

* La formulazione può essere compensata e/o corretta per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

DRBC (Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol Agar) è una modifica del Rose-Bengal-Chloramphenicol Agar (RBC) di Jarvis¹, ideato da King et al.² È raccomandato dalla norma ISO 21527-1³ per il conteggio di lieviti e muffe vitali nei prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione degli animali, con attività dell'acqua superiore a 0,95 e da FDA-BAM⁴ per l'analisi di campioni contenenti organismi "invasivi" (ad es. *Mucor*, *Rhizopus*, ecc.).⁴

È stato dimostrato che il dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina), in combinazione con rosa bengala, inibisce la diffusione di funghi mucoracei e limita il diametro delle colonie di altri generi in un terreno di conteggio dei funghi per alimenti.⁵ Il digerito enzimatico di tessuti animali e vegetali fornisce azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il fosfato monobasico di potassio tampona il terreno. Il solfato di magnesio migliora la crescita microbica. Le proprietà selettive del terreno sono aumentate dalla presenza di cloramfenicolo, un antibiotico ad ampio spettro, che è inibitore di un'ampia gamma di batteri Gram-negativi e Gram-positivi.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 31,6 g in 1000 ml di acqua purificata fredda e portare all'ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 44-47°C, mescolare bene e distribuire in aliquote da 15 mL in piastre Petri sterili. Evitare l'esposizione del terreno alla luce.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

| | |
|---|--|
| Aspetto del terreno in polvere | Fine granulometria omogenea, rosa |
| Aspetto del terreno in soluzione e in piastra | viola, da limpido a leggermente opalescente. |
| pH (20-25°C) | 5,6 ± 0,2 |

6 – MATERIALI FORNITI

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|---------------------------|-------------------------------|----------|------------------------|
| DRBC Chloramphenicol Agar | Terreno di coltura in polvere | 401393C2 | 500 g (15,8 L) |
| DRBC Agar | Piastre pronte all'uso | 541393 | 2 x 10 piastre ø 90 mm |

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre di Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione degli animali con un'attività dell'acqua superiore a 0,95 come uova, carne, latticini (escluso il latte in polvere), frutta, verdura, paste fresche, ecc. Preparare il campione da testare in conformità allo Standard Internazionale specifico per il prodotto in questione. Operare secondo le buone pratiche di laboratorio per la raccolta dei campioni, la conservazione e il trasporto al laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

La procedura di lavoro qui descritta è tratta dalla norma ISO 21527-1.³

1. Su una piastra di DRBC Agar, utilizzando una pipetta sterile nuova, trasferire 0,1 mL del campione se liquido o 0,1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.
2. Ripetere questa operazione con le diluizioni successive, utilizzando una nuova pipetta sterile per ogni diluizione decimale.
3. Per facilitare il conteggio di basse popolazioni di lieviti e muffe, un volume pari a 0,3 mL di una diluizione 10⁻¹ del campione, o del campione stesso se liquido, può essere distribuito su tre piastre.
4. Distribuire uniformemente il liquido sulla superficie dell'agar con un dispositivo sterile, fino a completo assorbimento del liquido nel terreno.
5. Incubare le piastre inoculate in aerobiosi in posizione verticale a 25 ± 1°C per 5 giorni.





10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare ogni caratteristica morfologica e cromatica specifica delle colonie. Se necessario, eseguire un esame con una lente binoculare o con un microscopio per distinguere tra cellule di lieviti o muffe e colonie di batteri. Leggere le piastre tra 2 e 5 giorni di incubazione. Selezionare le piastre contenenti meno di 150 colonie/propaguli/germi e contare queste colonie/propaguli/germi. Riportare come numero di colonie/propaguli/germi per grammo di alimento.

11 – CONTROLLO DI 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>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 | 25 ± 1°C / 5 gg/A | crescita |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | 25 ± 1°C / 5 gg/A | crescita |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404 | 25 ± 1°C / 5 gg/A | crescita con diffusione limitata |
| <i>Mucor racemosus</i> ATCC 42647 | 25 ± 1°C / 5 gg/A | crescita con diffusione limitata |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 25 ± 1°C / 5 gg/A | inibito |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 25 ± 1°C / 5 gg/A | inibito |

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, i campioni rappresentativi di tutti i lotti di DRBC Agar disidratato vengono testati per la produttività e la selettività confrontando i risultati con il lotto di riferimento: Sabouraud Dextrose Agar (produttività).

La produttività è testata mediante un test quantitativo di diffusione superficiale con i ceppi target *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. albicans* ATCC 10231, *P. chrysogenum* ATCC 10106, *A. brasiliensis* ATCC 16404, *M. racemosus* ATCC 42647; le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie ed incubate a 25 ± 1°C per 5 giorni in aerobiosi. Le colonie vengono contate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e viene calcolato il rapporto di produttività Pr. Se Pr è ≥ 0,5 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici e se la diffusione delle colonie è limitata, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato inoculando in superficie le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633. La crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

13-LIMITI DEL METODO

- I terreni contenenti rosa bengala sono sensibili alla luce; un'esposizione relativamente breve alla luce comporterà la formazione di composti inibitori.⁵
- Le spore delle muffe si disperdono nell'aria con grande facilità, maneggiare le piastre Petri con cura per evitare lo sviluppo di colonie satelliti che darebbero una sovrastima della popolazione nel campione.³
- Laddove la proliferazione batterica può rappresentare un problema, si raccomandano cloramfenicolo (50 mg/L) e clorotetraciclina (50 mg/L).³
- DRBC Agar e la procedura tratta dalla norma ISO 21527-1 non consentono il conteggio delle spore della muffa e non sono adatti per il conteggio dei funghi resistenti al calore, come *Byssoschlamys fulva* o *Byssoschlamys nivea*, in frutta e verdura in scatola o in bottiglia.³
- I metodi di conteggio dei lieviti e soprattutto delle muffe sono imprecisi perché essi sono costituiti da una miscela di micelio e spore asessuate e sessuate. Il numero di unità formanti colonie dipende dal grado di frammentazione del micelio e dalla proporzione di spore in grado di crescere sul terreno.³
- Si verifica spesso la non linearità dei conteggi con il metodo per diluizione, ovvero diluizioni di 10 volte dei campioni spesso non determinano riduzioni di 10 volte del numero di colonie recuperate sui terreni. Ciò è stato attribuito alla frammentazione del micelio e alla rottura degli agglomerati di spore durante la diluizione oltre all'inibizione competitiva che si verifica quando sulle piastre è presente un gran numero di colonie.³
- Anche se le colonie microbiche presenti sulle piastre sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire i test di identificazione su isolati, da coltura pura.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è per uso professionale e 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. DRBC Chloramphenicol Agar 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 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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni 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

Piastre pronte all'uso

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. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

Terreno in polvere

Conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Jarvis B. Comparison of an improved rose-bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food. J Appl Bacteriol 1973; 36: 723-727.
2. King DA, Hocking AD, Pitt JI. Dichloran-rose Bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods. Appl Environ Microbiol 1979; 37: 959-964.
3. ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
4. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), online. Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Content current as of: 10/31/2017.
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), online. BAM Media M183: Dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) agar. Content current as of: 10/16/2017.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | | |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|------------------------------|
| REF Numero di catalogo | LOT Numero di lotto | Fabbricante | Utilizzare entro | Proteggere dall'umidità | Fragile, maneggiare con cura |
| Limiti di temperatura | Contenuto sufficiente per <n> test | Consultare le Istruzioni per l'Uso | Lato superiore | Proteggere dalla luce | Monouso |

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

| Versione | Descrizione delle modifiche | Data |
|-------------|--|---------|
| Revisione 2 | Aggiornamento del contenuto e del layout | 01/2023 |

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

