

POTATO DEXTROSE AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno di uso generale per l'isolamento, la coltivazione e l'enumerazione di lieviti e muffe.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Estratto di patate	5,00 g
Glucosio	20,00 g
Agar	17,00 g

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

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Potato Dextrose Agar (PDA) è un terreno generico per l'isolamento, la coltivazione e il conteggio di lieviti e muffe. Soddisfa le specifiche di prestazione armonizzate EP, USP, JP¹, ove applicabili, e corrisponde al terreno FDA-BAM 127.²

Il PDA è raccomandato da FDA-BAM³ per la purificazione delle colonie contaminate con DG18 agar o DMRC e con l'aggiunta di clortetraciclina per il conteggio di lieviti e muffe nei cosmetici.⁴

L'APHA raccomanda l'uso di PDA per l'individuazione e il conteggio di muffe resistenti al calore negli alimenti, perché non sono nutrizionalmente esigenti e perché formano facilmente corpi fruttiferi, il che consente una rapida identificazione basata sul fenotipo.⁵

PDA e PDA con 50 mg/L di cloramfenicolo sono raccomandati dalle norme ISO 18416⁶ e ISO 16212⁷ come terreni alternativi al Sabouraud Dextrose Agar con e senza cloramfenicolo per la rilevazione di *C. albicans* e il conteggio di lieviti e muffe nei cosmetici.

L'estratto di patate favorisce la crescita rigogliosa dei funghi. Il pH basso favorisce la crescita dei funghi ed è leggermente inibitorio per i batteri contaminanti. Il glucosio, ad alta concentrazione, è una fonte di carbonio e di energia.

4-PREPARAZIONE

Sospendere 42 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino a ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e versare in piastre Petri sterili. Il terreno non deve essere ridisciolti più di una volta.

Per i cosmetici, raffreddare il terreno a 47-50°C dopo autoclavatura e aggiungere 4 mL di soluzione di clortetraciclina HCl all'1% sterilizzata tramite filtro (1 g/100 mL) per litro di terreno o aggiungere 4 mL del contenuto di una fiala di Dermatophyte Antimicrobial Supplement (REF 4240024) ricostituita con 5 mL di acqua purificata sterile (concentrazione finale nel terreno: 40 mg/L). In alternativa, aggiungere il contenuto di una fiala di Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003) a 1 litro di terreno prima di autoclavare (concentrazione finale nel terreno: 50 mg/L).

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in piastra	giallino chiaro, opalescente
pH (20-25°C)	5,6 ± 0,2

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Potato Dextrose Agar	Terreno disidratato	4019352	500 g (11,9 L)
		4019354	5 kg (119 L)
Potato Dextrose Agar	Piastre pronte	541935D	2 x 10 piastre ø 90 mm. Senza distanziatori

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, piastre di Petri, beute, terreni di coltura e reagenti ausiliari. Dermatophyte Antimicrobial Supplement (REF 4240024), Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003).

8-CAMPIONI

Alimenti e cosmetici. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.¹⁻⁶

9-PROCEDURA DELL'ANALISI E INTERPRETAZIONE

Conteggio di lieviti e muffe nei cosmetici⁴

1. Utilizzare la tecnica della semina in superficie per facilitare il riconoscimento dei diversi tipi di colonie. Diluire decimalmente la preparazione cosmetica per ottenere una serie completa di diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻³. Mescolare accuratamente e seminare tutte le diluizioni in piastre in doppio.

2. Versare asetticamente 0,1 mL di ciascuna diluizione su piastre di Potato Dextrose Agar solidificato con 40 mg/L di clortetraciclina e spargere l'inoculo con una bacchetta ad L di vetro sterile.

3. Dopo che l'inoculo è stato assorbito dal terreno, incubare le piastre a 30 ± 2°C (non capovolgere e non impilare più di 3 piastre).

4. Contare le colonie dopo 5 giorni di incubazione. Se non c'è crescita dopo 5 giorni, reincubare per altre 48 ore.

Conteggio delle muffe resistenti al calore⁵

1. Riscaldare il campione omogeneizzato per 30 minuti a 75°C-80°C e raffreddare rapidamente a 55°C.

2. Mescolare accuratamente la sospensione raffreddata con un volume uguale di Potato Dextrose Agar a 45°C e distribuire in piastre Petri da 150 mm di diametro.

3. Chiudere ermeticamente le piastre Petri e incubare a 30°C per almeno 14 giorni. Le colonie formate dalla maggior parte delle ascospore attivate saranno visibili in 7-10 giorni, mentre le ascospore danneggiate dal calore o debilitate richiedono più tempo per formare colonie.

Per altre applicazioni, l'utilizzatore è responsabile della scelta del tempo e della temperatura di incubazione appropriati in base al campione trattato, ai requisiti degli organismi da recuperare e ai protocolli locali applicabili.





10-CONTROLLO QUALITA'

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore finale 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 elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	25°C / 72 h / A	buona crescita, colonie bianche simili a lieviti
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 9642	25°C / 72 h / A	buona crescita, colonie con ife nere

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

11-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Potato Dextrose Agar disidratato e pronto all'uso (Lotto di prova: TB) viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un Lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi *C. albicans* ATCC 18808, *A. brasiliensis* ATCC 9642, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *P. chrysogenum* ATCC 10106. Dopo l'incubazione a 25°C per un massimo di 72 ore, vengono valutate e registrate le crescite in piastre e le caratteristiche delle colonie, esse devono risultare comparabili in TB e RB.

La selettività viene valutata con il metodo modificato Miles-Misra, inoculando la superficie delle piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland del ceppo non target *S. aureus* ATCC 25923. La crescita del ceppo non target è parzialmente inibita.

12-LIMITI DEL METODO

- Il Potato Dextrose Agar ha scarse proprietà selettive; nei casi in cui la sovracrescita batterica può essere un problema, si raccomanda il cloramfenicolo (50 mg/L) o la clortetraciclina (40 mg/L).
- Le spore delle mufte si disperdono nell'aria con grande facilità; maneggiare le piastre di Petri con cura per evitare lo sviluppo di colonie satelliti che darebbero una sovrastima della popolazione nel campione.⁸
- I metodi di conteggio dei lieviti e soprattutto delle mufte sono imprecisi perché esse sono costituite 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 di coltura.⁸
- Spesso si verifica una non linearità dei conteggi tra piastre e diluizione, cioè le diluizioni di 10 volte dei campioni spesso non si traducono in riduzioni di 10 volte del numero di colonie recuperate sui terreni di coltura. Questo è stato attribuito alla frammentazione dei miceli e alla rottura degli ammassi di spore durante la diluizione, oltre che all'inibizione competitiva quando un gran numero di colonie è presente sulle piastre.⁸
- Per un'identificazione completa dei microrganismi isolati, si raccomanda di eseguire test appropriati utilizzando colture pure.

13-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è destinato ai 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 in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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.
- Ogni piastra pronta per l'uso di questo terreno di coltura è esclusivamente monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 del prodotto, 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.

14 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno disidratato

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).



Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare le piastre nella loro confezione originale a +2 / +8°C al riparo dalla luce diretta. Se correttamente conservate, le piastre possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Non utilizzare le piastre oltre questa data. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate per 7 giorni se conservate in un'area pulita a +2 / +8°C. Non utilizzare le piastre se la busta di plastica è danneggiata. Non utilizzare le piastre con segni di deterioramento (ad es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimento o screpolatura del terreno, colore atipico, eccesso di umidità).











L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione 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).

Secondo MacFaddin⁷ le piastre preparate in laboratorio possono essere conservate a +2°C /+8°C al buio e protette contro l'evaporazione fino a 6-8 settimane.⁹

15- BIBLIOGRAFIA

1. European Pharmacopoeia 11th Edition, 2022, Vol. 1; 2.6.13 Microbiological Examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms: 01/2021:20631.
2. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), online. BAM Media M127: Potato Dextrose Agar. Content current as of: 10/17/2017.
3. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), online. BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Content current as of: 11/07/2022.
4. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), online. BAM Chapter 23: Methods for Cosmetics. Content current as of: 12/23/2021.
5. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.
6. ISO18416:2015. Cosmetics — Microbiology — Detection of *Candida albicans*.
7. ISO 16212:2017 Cosmetics — Microbiology — Enumeration of yeast and mould.
8. 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.
9. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

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

