

# RAPID PERFRINGENS MEDIUM (RPM) BASE INSTANT WHOLE MILK POWDER RPM SELECTIVE SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere, supplemento in polvere e supplemento selettivo liofilo

## 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'arricchimento di *Clostridium perfringens*, in accordo con la norma ISO 15213-3 e la sua identificazione presuntiva.

## 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \*

### RAPID PERFRINGENS MEDIUM (RPM) BASE

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

Estratto di lievito	11,0 g
Digerito enzimatico di caseina	15,0 g
Peptone	10,0 g
Glucosio	10,5 g
Sodio tioglicolato	0,5 g
Sodio cloruro	5,5 g
L-cistina	0,5 g
Resazurina	0,001 g
Potassio fosfato bibasico	10,0 g
Ferro (II) solfato · 7H <sub>2</sub> O	1,0 g
Gelatina	120,0 g
Agar	1,4 g

### INSTANT WHOLE MILK POWDER (CONTENUTO DELLA CONFEZIONE)

Latte intero in polvere	300 g
-------------------------	-------

### RPM SELECTIVE SUPPLEMENT (FLACONE PER 500ML DI TERRENO COMPLETO)

Neomicina solfato	37,5 mg
Polimixina B	6,25 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 cotte e conservate senza essere adeguatamente riscaldate o refrigerate prima di essere servite.<sup>1</sup> La determinazione di *C. perfringens* nei campioni di cibo 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.

Nel 1978 venne pubblicato il primo studio che dimostrò le ottime performances del Rapid Clostridium Medium rispetto al terreno SPS. Vennero testati 774 campioni contaminati naturalmente da *C. perfringens*: 546 (71%) risultarono positivi su RPM e solo 168 (22%) su SPS agar<sup>2</sup>.

Il Rapid Perfringens Medium (RPM) è stato sviluppato da Erickson e Deibel<sup>2</sup> per la rilevazione e la stima di un basso numero di *C. perfringens* negli alimenti con metodo MPN in provetta ed è raccomandato dalla norma ISO 15213-3:2024<sup>3</sup> come terreno di arricchimento selettivo per *C. perfringens* prima della semina su TSC Agar e LENA. Il terreno consente l'identificazione presuntiva di *C. perfringens* grazie alla caratteristica reazione di coagulazione e produzione di gas (*stormy fermentation*).

Il Rapid Perfringens Medium è costituito da due soluzioni, preparate separatamente, che poi vengono unite dopo la sterilizzazione. Il terreno completo contiene tutti gli elementi necessari per favorire la crescita dei ceppi di *Clostridium* come peptoni, cloruro di sodio, glucosio; la L-cistina ed il sodio tioglicolato sono agenti riducenti che favoriscono l'anaerobiosi. Il latte intero consente di visualizzare la reazione di fermentazione. La selettività è assicurata dagli antibiotici polimixina B solfato e neomicina solfato, abbinati ad una temperatura di incubazione di 46° C.

## 4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Allestire le due soluzioni separatamente.

### Soluzione RPM

Sospendere 46,35 g in 250 mL di acqua purificata fredda. Sciogliere la polvere, scaldando se necessario e sterilizzare a 121°C per 5 minuti. Raffreddare a 44-47°C.

### Soluzione Instant Whole Milk Powder

Sospendere 25 g in 250 mL di acqua purificata fredda. Miscelare bene e sterilizzare a 121°C per 5 minuti. Raffreddare a 44-47°C e aggiungere il contenuto di un flacone di RPM Selective Supplement (REF 4240051) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile.

Unire le due soluzioni, miscelare bene e distribuire in provette sterili (9 mL) o flaconi sterili (90 mL). Se non utilizzato entro 8 ore, appena prima dell'uso, riscaldare in acqua bollente o vapore acqueo per 15 minuti, quindi raffreddare rapidamente fino alla temperatura di incubazione.

## 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

### RAPID PERFRINGENS MEDIUM (RPM)

Aspetto della polvere RPM	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della polvere Instant Whole Milk	finissima granulometria, color bianco panna
Aspetto della soluzione completa	soluzione lattescente, opaca
pH finale (20-25 °C)	6,8 ± 0,2



**RPM SELECTIVE SUPPLEMENT**

Aspetto del supplemento liofilo

pastiglia bassa, bianca

Aspetto del supplemento ricostituito

incolore, limpido

**6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rapid Perfringens Medium (RPM) Base	Terreno di coltura in polvere	4019842	500 g (5,3 L terreno completo)
Instant Whole Milk Powder	Materia prima/supplemento	4120502	300 g (6 L di terreno completo)
RPM Selective Supplement	Supplemento liofilo	4240051	10 flaconi, ciascuno per 500mL di terreno completo

**7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI**

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette, apparecchiatura appropriata per la coltura anaerobica, terreni di coltura e reagenti ausiliari per l'identificazione delle colonie.

**8 – CAMPIONI**

Prodotti destinati al consumo umano ed all'alimentazione animale, campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione di alimenti e mangimi, campioni della fase di produzione primaria. 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>3</sup>

**9 – PROCEDURA DELL'ANALISI****Determinazione di *C. perfringens* negli alimenti secondo ISO 15213-3:2024<sup>3</sup>**

- Preparare la sospensione iniziale nel caso in cui il prodotto in esame non sia liquido. Aggiungere 1 mL di campione liquido o 1 mL di sospensione iniziale (0,1 g di prodotto) a 9 mL di Rapid Perfringens Medium-RPM. In alternativa 10 mL di campione liquido o 10 mL della sospensione iniziale (1 g di prodotto) possono essere aggiunti a 90 mL di Rapid Perfringens Medium-RPM
- Incubare per  $18 \pm 2$  ore a 46°C.
- Portare a temperatura ambiente le piastre per il trapianto successivo, se conservate a basse temperature, ed asciugare la superficie se necessario.
- Seminare 10 µL dell'arricchimento in RPM su piastra di TSC Agar (REF 402158) e 10 µL su piastra di LENA (REF 401573)
- Incubare in anaerobiosi il TSC Agar a 37°C per  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  ed il LENA a 46°C per  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$
- Prelevare 5 colonie tipiche da entrambe le piastre e seminarle su un terreno non selettivo (es. Columbia Blood Agar REF 541136 o un terreno non selettivo altamente nutritivo, come BHI Agar) ed incubare in atmosfera anaerobica per  $20 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a 37°C.
- Procedere con i test di conferma: test della fosfatasi acida (REF 192010) o SIM Agar test (REF 402037).

**Conteggio di *C. perfringens* con metodo MPN<sup>2</sup>**

- Preparare la sospensione iniziale nel caso in cui il prodotto in esame non sia liquido. Aggiungere 1 ml di campione liquido o 1 ml di sospensione iniziale (0,1 g di prodotto) e 1 ml delle successive diluizioni a 9 ml di Rapid Perfringens Medium-RPM, secondo uno schema MPN con tre provette per ciascuna diluizione.
- Incubare a 46°C per 18-24 ore

**10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI****Metodo ISO 15213-3**

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica sulle piastre di TSC Agar e di LENA e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Su LENA, *C. perfringens* produce colonie gialle a seguito della fermentazione del lattosio, con alone opaco di lecitinasi.

Su TSC Agar, *C. perfringens* produce solitamente colonie nere o grigio-giallo-brune come risultato della riduzione del solfito a solfuro.

Test di conferma: le colonie di *C. perfringens* sono positive al test della fosfatasi acida, o sono positive alla produzione di solfito, negative alla produzione di indolo ed alla mobilità su SIM Agar.

**Metodo MPN**

Le provette sono considerate positive se si osserva coagulazione e formazione di gas (*stormy fermentation*).

**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***C. perfringens* ATCC 13124*E. coli* ATCC 25922**INCUBAZIONE T°/ T - ATM**

46°C/ 16-20 ore

46°C/ 16-20 ore

**RISULTATI ATTESI**

crescita con fermentazione visibile

totale inibizione

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 Rapid Clostridium Medium disidratato addizionato di RPM Selective Supplement, viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Il terreno viene testato inoculando le provette con *C. perfringens* ATCC 13124 e *C. perfringens* ATCC 12916 con il metodo delle diluizioni ad estinzione. Dopo incubazione a 46°C per 16-20 ore *C. perfringens* mostra una fermentazione visibile.

Per valutare la selettività, il terreno viene inoculato con *E. coli* ATCC 25922: dopo incubazione a 46°C per 20 ore non sono visibili cambiamenti apprezzabili del terreno e, dopo trapianto di 10 µL su Mac Conkey Agar, non vi è alcuna crescita.

**13 - LIMITI DEL METODO**

- Il terreno consente un'identificazione solo presuntiva di *C. perfringens* ed è quindi necessario procedere agli appropriati test di conferma.
- Il terreno, se non utilizzato entro 8 ore necessita di un riscaldamento preventivo per eliminare l'ossigeno e favorire la liquefazione dello stesso, in modo da poter inoculare sia campioni solidi che liquidi.





### 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.
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Il supplemento selettivo è classificato come pericoloso. 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.
- Fare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento selettivo è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente 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

#### Terreno disidratato e supplemento in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni i prodotti sono validi sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Evitare di aprire i flaconi in ambienti umidi. Una volta aperti, conservare i prodotti mantenendo i tappi dei contenitori ben chiusi. Eliminare i prodotti nel caso i contenitori e/o i tappi 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 selettivo liofilo

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).

Secondo la norma ISO 15213-3 il terreno di base sterilizzato può essere conservato per un massimo di 4 settimane a 2-8°C in contenitori o provette chiuse; prima dell'uso il terreno deve essere ridisciolto completamente e raffreddato a 44 °C - 47 °C. La soluzione sterilizzata di Instant Whole Milk può essere conservata a 2-8°C per un massimo di 4 settimane in contenitori o provette chiuse.<sup>3</sup>

### 16 - BIBLIOGRAFIA

- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 16: Clostridium perfringens.
- J.E. Erickson, R.H. Deibel. New medium for rapid screening and enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. Applied and environmental microbiology, American Society for Microbiology, Oct. 1978, p567-571
- ISO/TS 15213-3:2024 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. – Part 3: detection of *Clostridium perfringens*.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF or 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> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 0	Prima pubblicazione	03/2025

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

