CLOSTRIDIUM BOTULINUM AGAR BASE
CLOSTRIDIUM BOTULINUM ANTIMICROBIC SUPPLEMENT
Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo

1 – DESTINAZIONE D'USO
Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *Clostridium botulinum* da alimenti e altri materiali.

2 – COMPOSIZIONE
CLOSTRIDIUM BOTULINUM AGAR BASE
FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Idrolizzato pancreatico di caseina	40 g
Estratto di lievito	5 g
Glucosio	2 g
Sodio fosfato bibasico	5 g
Sodio clorur	2 g
Magnesio solfato	0,01 g
Agar	20 g

CLOSTRIDIUM BOTULINUM ANTIMICROBIC SUPPLEMENT
(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML)

D-cicloserina	125 g
Trimetroprim	2 g
Sulfametoxazolo	38 g

* Le formule possono essere adattate e/o integrate per soddisfare i criteri di prestazione richiesti.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO
Clostridium botulinum è un batterio sporigeno anaerobico a forma di bastoncino che produce una proteina neurotossica.
In determinate condizioni, questi organismi possono crescere negli alimenti, producendo tossine.[1]
Clostridium Botulinum Agar Base addizionato con Clostridium Botulinum Antimicrobic Supplement corrisponde alla formulazione ideata da Dezfulian et al. per la rilevazione di *C. botulinum* nelle feci e chiamato CBI medium.[2]
Secondo Dezfulian, i test qualitativi hanno rilevato il recupero completo di *C. botulinum* di tipo A, B, F e G. Inoltre sul terreno CBI medium si è facilmente ottenuto l'isolamento di *C. botulinum* di tipo A, B e F da campioni fecali.[1]
Il terreno Biolife è stato utilizzato per la valutazione di un focolaio familiare di botulismo alimentare da Pavic et. al.[3] Gli autori hanno riportato che questo terreno è più adatto per l'isolamento del *C. botulinum* lecitinolitico di tipo A, B e F rispetto a Sulphite Agar e Columbia Agar.
Il digerito pancreatico di caseina fornisce azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine in particolare del gruppo B. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il sodio difosfato agisce da tampone mentre il solfato di magnesio aiuta la sporulazione dei microrganismi. Il tuorlo d'uovo è il substrato per rilevare le attività della lecitinasi e della lipasi. La lecitinasi degrada la lecitina producendo un precipitato opaco e insolubile nel terreno che circonda le colonie. La lipasi scompone i grassi liberi provocando una lucentezza iridescente sulla superficie delle colonie. La miscela di D-cicloserina, trimetoprim e sulfametoxazolo aiuta l'isolamento selettivo di *C.botulinum* inibendo la flora accessoria.

4 - PREPARAZIONE
Sospendere 37 g in 450 mLdi acqua purificata fredda; riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.
Raffreddare a 47-50°C e aggiungere, in condizioni di asepsi, il contenuto di una fiala di Clostridium Botulinum Antimicrobic Supplement ricostituito con 2,5 mL di acqua purificata sterile, seguita da 25 mL di acetone e 50 mL di Egg Yolk Emulsion (ref.4244150). Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO
Clostridium Botulinum Agar Base

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	giallo, opalescente
Aspetto del terreno in piastra	giallo, opaco
pH (20-25 °C)	7,4 ± 0,2

Clostridium Botulinum Antimicrobic Supplement

Aspetto del liofilo	pastiglia bianca, alta e compatta
Aspetto del supplemento ricostituito	soluzione incolore leggermente opalescente

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Clostridium Botulinum Agar Base	Terreno in polvere	4013062	500 g (6,7 L)
Clostridium Botulinum Antimicrobic Supplement	Supplemento liofilo	4240066	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI
Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre Petri sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano, Italia.
Tel. +39 02 25209.1, Fax +39 02 2576428
E-mail: mktg@biolifeitaliana.it; web: www.biolifeitaliana.it

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 ai regolamenti internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare l'omogeneizzato alimentare e le diluizioni seriali del campione sulla superficie delle piastre. Incubare in atmosfera anaerobica a 35-37° per 48 ore.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie.
C. botulinum cresce con grandi colonie circondate da un alone opaco di precipitazione del tuorlo d'uovo con una lucentezza iridescente sulla superficie della colonia.

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio.

12 – LIMITI DEL METODO

- La selettività del terreno può interferire con l'isolamento di ceppi di *C. botulinum* meno resistenti di tipo G e non proteolitici di tipo F.[2]
- Sebbene sul terreno possa essere isolato anche il *C. botulinum* tipo G, la mancanza di attività della lipasi rende più difficile la differenziazione delle colonie di questo microrganismo da quelle di altri batteri.[2]
- Sebbene questo terreno sembri essere superiore ai terreni non selettivi, si raccomanda l'uso simultaneo di entrambi i terreni per l'isolamento di *C. botulinum* dal campione primario e, se necessario, dalla coltura arricchita, per evitare la perdita di ceppi sensibili di *C. botulinum* come alcuni ceppi di tipo E.[2]

13 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento 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 il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Clostridium Botulinum Antimicrobic Supplement 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Il supplemento é sterilizzato 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.
- 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.

14 – 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).

15- BIBLIOGRAFIA

1. FDA-BAM Chapter 17: Clostridium botulinum. Content current as of:10/31/2017
2. Dezfulian M, McCroskey LM, Hatheway CL, Dowell Jr VR. Selective medium for isolation of Clostridium botulinum from human feces. J Clin Microbiol 1981; Mar; 13(3):526-31.

3. Pavic, S et al. About suitability of C.Botulinum Agar for the isolation of B type C.botulinum from dry cured dalmatian ham and stools of patients during family outbreack. Zavod za javno zdravstvo Zupanije splitsko-dalmatinske. 2000.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o 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	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	2023/01

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

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano, Italia.
Tel. +39 02 25209.1, Fax +39 02 2576428
E-mail: mktg@biolifeitaliana.it; web: www.biolifeitaliana.it