

# m-CP AGAR BASE

## m-CP ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

### m-CP SUPPLEMENTS A / B / C

## m-CP AGAR

Terreno di coltura in polvere, terreno pronto all'uso in piastre e supplementi selettivi

### 1 - DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento, il conteggio e l'identificazione presuntiva di *Clostridium perfringens* da campioni di acqua.

### 2 – COMPOSIZIONE\*

#### M-CP AGAR BASE

##### FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA

Triptosio	30,0 g
Estratto di lievito	20,0 g
Saccarosio	5,0 g
L-cisteina HCl	1,0 g
Magnesio solfato 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Agar	13,2 g
Bromocresolo porpora	0,04 g

#### M-CP ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

##### CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO

Polymyxina B solfato	12.5 mg (105,000 IU)
D-cicloserina	200 mg

#### M-CP SUPPLEMENT A

##### CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO

Fenoltaleina difosfato	750 mg
------------------------	--------

#### M-CP SUPPLEMENT B

##### CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO

Cloruro ferrico	700 mg
-----------------	--------

#### M-CP SUPPLEMENT C

##### CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO

Indoxyl β-D glucoside	450 mg
-----------------------	--------

#### M-CP AGAR – PIASTRE PRONTE ALL'USO

M-CP Agar Base	69,7 g
Polymyxina B solfato	25 mg (210,000 IU)
D-Cicloserina	400 mg
Fenoltaleina difosfato	100 mg
Cloruro ferrico	90 mg
Indoxyl β-D glucoside	60 mg
Acqua purificata	1000 mL

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

m-CP Agar è un terreno selettivo e cromogeno per l'isolamento, il conteggio e l'identificazione presuntiva di *Clostridium perfringens* da campioni di acqua. m-CP Agar è stato ideato da Bisson e Cabelli<sup>1</sup> che hanno incluso una serie di test differenziali compatibili in un terreno selettivo da utilizzare in una procedura con membrane filtranti. Il terreno è stato raccomandato dalla Direttiva del Consiglio Europeo 98/83/EC<sup>2</sup> nella sua stesura originale per l'esame delle acque destinate al consumo umano. La modifica del 6 ottobre 2015<sup>3</sup> della Direttiva fa riferimento alla EN ISO 14189<sup>4</sup> per il conteggio di *C. perfringens*, comprese le spore.

Il triptosio fornisce azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine in particolare del gruppo B. L-cisteina cloridrato è un agente riducente. I sali di magnesio e ferro favoriscono la crescita microbica. Il saccarosio è il carboidrato fermentabile e il bromocresolo porpora è un indicatore di pH: i batteri che fermentano il saccarosio presentano colonie gialle a causa del cambiamento di colore dell'indicatore di pH. L'indossil-β-D-glucoside è un substrato cromogenico per la β-D-gucosidasi che scinde il substrato con la formazione di un cromoforo blu (*C. perfringens* non scinde il cromogeno). La presenza di fosfatasi determina la scissione della fenoltaleina difosfato, evidenziata dallo sviluppo di una colorazione rosa-rossa in seguito a esposizione delle colonie a vapori di idrossido di ammonio; non si vedrà alcun cambiamento di colore con colonie di microrganismi che non possiedono fosfatasi acida. *C. perfringens* non scinde l'indoxil-β-D-glucoside, fermenta il saccarosio ed è positivo alla fosfatasi. La D-cicloserina e la polimixina B aiutano l'isolamento selettivo di *C. perfringens* inibendo la flora contaminante.

### 4 – PREPARAZIONE

Sospendere 34,7 g in 500 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti e raffreddare a 47-50°C. Aggiungere il contenuto di una fiala di m-CP Antimicrobic Supplement (REF 4240070) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Con le precauzioni dell'asepsi, aggiungere, le seguenti soluzioni, preparate con i composti in polvere forniti con le fiale di m-CP Supplements A, B e C disciolti in acqua purificata e sterilizzate per filtrazione:



Fenottaleina difosfato (REF 4240070A)	soluzione allo 0,5%	10 mL in 500 mL di terreno di base
Cloruro Ferrico Esaidrato (REF 4240070B)	soluzione al 4,5%	1 mL in 500 mL di terreno di base
Indoxyl $\beta$ -D glucoside (REF 4240070C)	soluzione allo 0,75%	4 mL in 500 mL di terreno di base

Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

### 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

#### m-CP Agar Base

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, blu pallido
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra pH (20-25°C)	viola, limpido
	7,6 $\pm$ 0.2

#### m-CP Antimicrobial Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato	pastiglia bassa, compatta, bianca
Aspetto della soluzione	limpido, incolore

#### m-CP Supplement A

Aspetto della polvere	polvere da bianco a giallo pallido o marrone chiaro
-----------------------	---

#### m-CP Supplement B

Aspetto della polvere	polvere da giallo pallido a giallo-marrone
-----------------------	--

#### m-CP Supplement C

Aspetto della polvere	polvere quasi bianca
-----------------------	----------------------

### 6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
m-CP Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4013202	500 g (7,2 L)
m-CP Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240070	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
m-CP Supplement A (Phenolphthalein diphosphate)	Supplemento in polvere	4240070A	1 flacone (750 mg per 500 g of terreno)
m-CP Supplement B (Ferric chloride)	Supplemento in polvere	4240070B	1 flacone (700 mg per 500 g of terreno)
m-CP Supplement C (Indoxyl $\beta$ -D-glucoside)	Supplemento in polvere	4240070C	1 flacone (450 mg per 500 g of terreno)
m-CP Agar	Piastre pronte all'uso	491320	3 x 10 piastre, $\varnothing$ 55 mm

### 7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, filtri a membrana, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre Petri sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

### 8 – CAMPIONI

Campioni d'acqua. Fare riferimento agli standard internazionali applicabili per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni e operare secondo le buone pratiche di laboratorio.

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

1. Filtrare un volume adeguato di campione attraverso una membrana di acetato di cellulosa o nitrato di cellulosa da 0,45  $\mu$ m.
2. Con le precauzioni dell'asepsi, adagiare la membrana filtrante sulla superficie dell'agar m-CP preparato come descritto sopra, in modo da evitare la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie dell'agar.
3. Incubare in condizioni anaerobiche per 21  $\pm$  3 ore a 44  $\pm$  1° C.

### 10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie. Su m-CP Agar si possono osservare le seguenti colonie tipiche:

Microrganismo	Caratteristiche delle colonie	Saccarosio	$\beta$ -D-glucosidasi	Fosfatasi
<i>C. perfringens</i>	Giallo opaco; rosa/rosso dopo l'esposizione ai vapori di idrossido di ammonio	+	-	+
Altri Clostridi ( <i>C. baratii</i> , <i>C. paraputrificum</i> , <i>C. tertium</i> )	Blu-verde	+	+	
Altri Clostridi ( <i>C. bifermentans</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. sporogenes</i> )	Viola	-	+ or -	
Altri Clostridi	Giallo opaco, negative all'esposizione ai vapori di idrossido di ammonio	+	-	-

### 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 comunemente responsabilità 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.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	44°C/ 18-24 H / AN	buona crescita, colonie gialle opache, rosso/rosa dopo esposizione ad ammonio
<i>C. bifermentans</i> NCTC 506	44°C/ 18-24 H / AN	crescita con colonie blu
<i>E. coli</i> ATCC 25922	44°C/ 18-24 H / AN	totalmente inibiti

AN: incubazione in anaerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection





### 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di m-CP Agar Base addizionato con m-CP Antimicrobic Supplement e m-CP Supplement A, B, and C, vengono testati per produttività e selettività con ceppi target e non target, con incubazione a 44°C per 18-24 ore, confrontando i risultati con piastre di Blood Agar.

La produttività viene testata con metodo quantitativo con il ceppo target *C. perfringens* ATCC 13124. I filtri adagiati sulle piastre vengono inoculati con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie ed incubati a 44°C per 18-24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività Pr. Se Pr è  $\geq 0,5$  e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie gialle rosa-rosse dopo esposizione a vapori di idrossido di ammonio) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità è testata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con *C. bifermentans* NCTC 506. Dopo incubazione *C. bifermentans* mostra una buona crescita con colonie blu, fosfatasi negative.

La selettività è testata con metodo Miles-Misra modificato con i seguenti ceppi non target: *P. mirabilis* ATCC 10005, *P. vulgaris* ATCC 9484, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 18804 e *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo l'incubazione, la crescita di *P. mirabilis*, *P. vulgaris* ed *E. coli* è totalmente inibita mentre *P. aeruginosa*, *C. albicans* ed *E. faecalis* sono parzialmente inibiti.

### 13 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono da intendersi solo per controlli microbiologici e per uso professionale e 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 base e i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. M-CP Supplement B è classificato come pericoloso dalla 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](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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- Ciascuna piastra 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.
- 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 il terreno e il supplemento non utilizzato 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 la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 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

#### Piastre pronte all'uso

Conservare nella confezione originale a +2 /+8°C al riparo dalla luce diretta. 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 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).

#### 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).

#### Supplementi in polvere

m-CP Supplement A: dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a -20°C al riparo della luce.

m-CP Supplement B: dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +10/+30°C al riparo della luce.

m-CP Supplement C: dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a -20°C al riparo della luce.

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

### 15 - BIBLIOGRAFIA

1. Bisson JW, Cabelli VJ. Membrane filter enumeration method for *Clostridium perfringens*. Appl Environ Microbiol 1979; 37: 55-88.

2. E.U. (1998) 98/83/EC of Council of 3rd of November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Off J Eur Commun L330: 32-54





3. Commission Directive (EU) 2015/1787 of 6 October 2015 amending Annexes II and III to Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. Off J Eur Commun L260: 6-17
4. ISO 14189:2013 Water quality - Enumeration of *Clostridium perfringens* - Method using membrane filtration

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

<b>REF</b> o REF Numero di catalogo	<b>LOT</b> Numero di lotto	 Monouso	 Fabbricante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Utilizzare entro	 Fragile maneggiare con cura	 Proteggere dalla luce diretta

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del Layout	01/2023

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

