

IRON SULFITE AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in flacone

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento e il conteggio di *Clostridium* spp. solfito-riduttori in campioni della catena alimentare.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Peptone	15,0 g
Peptone di Soia	5,0 g
Estratto di Lievito	5,0 g
Sodio metabisolfito	0,5 g
Ferro (III) ammonio citrato	1,0 g
Agar	15,0 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I clostridi solfito-riduttori sono batteri anaerobi di grandi dimensioni, a forma di bastoncino, Gram-positivi, che formano spore e sono ampiamente presenti nella polvere, nel suolo, nella vegetazione e come normale flora nel tratto gastrointestinale dei mammiferi. Le specie più importanti che appartengono a questo gruppo sono *C. perfringens*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes* e *C. botulinum*. I clostridi solfito-riduttori possono essere ricercati come organismo indice di contaminazione clostridiale, come indicatori di igiene generale o come mezzo per individuare difetti nella lavorazione degli alimenti.

Iron Sulphite Agar è stato sviluppato per la prima volta da Wilson e Blair¹ per il conteggio di *C. perfringens* (*B. welchii*) nelle acque.

L'attuale formulazione, con una concentrazione ridotta di sodio metabisolfito, è conforme alla norma ISO 15213-1.²

Il terreno di coltura sfrutta la capacità di *Clostridium* spp. di ridurre il solfito, che reagisce con il ferro ammonio citrato formando solfuro ferroso che colora le colonie di nero.³ I peptoni e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, minerali, vitamine e aminoacidi per la crescita microbica. L'agar è l'agente solidificante.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE

TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 41,5 g in 1000 mL di acqua depurata fredda. Riscaldare fino a ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 44-47 °C, mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

FLACONI:

Liquefare il contenuto del flacone in autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnomaria a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un recipiente con acqua, posto su una piastra riscaldante e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare a 44-47°C e versare il terreno di coltura in piastre di Petri sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione e del terreno in flacone	ambra, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,6 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Iron Sulfite Agar	Terreno di coltura in polvere	4015652	500 g (12 L)
Iron Sulfite Agar	Flaconi pronti all'uso	5115652	6 x 100 mL

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio come richiesto, beute, piastre di Petri sterili, generatori di atmosfera controllata e giare, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Alimenti e mangimi, campioni ambientali dell'area di produzione e manipolazione di alimenti e mangimi; campioni della fase di produzione primaria. 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.²

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

- Preparare il campione da testare, la sospensione iniziale e le diluizioni, in conformità alla norma internazionale specifica per il prodotto in questione.
- Se si intende contare solo le spore, entro 15 minuti dalla preparazione della sospensione iniziale, riscaldare la serie di diluizioni decimali in un bagno maria a 80 °C per 10 minuti ± 1 minuto.
- Trasferire con pipette sterili 1 mL del campione in esame (se liquido) o 1 mL della sospensione iniziale e 1 mL di ciascuna diluizione decimale, in doppio, al centro di piastre Petri vuote. Quando, per alcuni prodotti, è necessario contare un basso numero di *Clostridium* spp. solfito-riduttori, il limite di conteggio può essere abbassato esaminando 10 mL della sospensione iniziale in tre piastre Petri grandi (140 mm).
- Versare circa 12-15 mL per le piastre Petri da 90 mm o 45-50 mL per le piastre Petri da 140 mm di Iron Sulfite Agar sciolto e mantenuto a 44 C-47 °C in ciascuna piastra Petri e mescolare bene con l'inoculo.
- Quando il terreno si è solidificato, versare circa 5 mL del terreno ISA per le piastre Petri da 90 mm o 10 mL per le piastre Petri da 140 mm come copertura, per evitare lo sviluppo di colonie sulla superficie del terreno.
- Lasciare solidificare e incubare in giare per anaerobiosi o altri contenitori adatti e incubare a 37 °C per 48 ± 2 ore. Un'incubazione più lunga può causare un eccessivo annerimento delle piastre.





Nota: per il conteggio di *Clostridium* spp. solfito-riduttori nei mangimi è necessario applicare un protocollo speciale. Per la procedura dettagliata, consultare la norma ISO 15213-1.²

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie. Contare le colonie nere sulle piastre contenenti meno di 150 colonie caratteristiche (per le piastre Petri da 90 mm) o meno di 360 colonie (per le piastre Petri da 140 mm). Scegliere a caso cinque di queste colonie da sottoporre a subcoltura per i test di conferma. Per una spiegazione completa dei criteri e dei metodi di identificazione, consultare il riferimento citato.²

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti del prodotto vengono messi in 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	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	37°C/ 48 H / AN	crescita, colonie nere
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C/ 48 H / AN	crescita, nessun annerimento delle colonie

AN: incubazione anaerobica; 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 Iron Sulfite Agar disidratato (Lotto di prova:TB) viene valutato per la produttività e la specificità con ceppi target e non target, confrontando i risultati con un lotto precedentemente approvato e con piastre di Tryptic Soy Agar (TSA).

La produttività è testata con tecnica quantitativa per inclusione con i ceppi target *C. perfringens* ATCC 13124 e *C. perfringens* ATCC 12916. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 37°C per 48 ore. Le colonie vengono contate per entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{TB}/UFC_{TSA}). Se Pr è $\geq 0,5$ e se la morfologia e il colore delle colonie è tipico (colonie nere), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità è testata con il ceppo non target *E. coli* ATCC 25922. Il ceppo non target mostra una buona crescita con colonie incolori.

13 – LIMITE DEL METODO

Può verificarsi un annerimento diffuso e aspecifico del terreno di coltura. Anche la crescita di batteri anaerobi, che producono idrogeno (non H₂S), può ridurre il solfito presente e portare a un generale annerimento del terreno di coltura, rendendo difficile il conteggio delle colonie tipiche.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; 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. 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 Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette e i flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno in flacone. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area 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.
- 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

Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).





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).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia (piastre, provette, flaconi) e delle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 15213-1, il terreno di coltura può essere conservato a +2°C /+8°C per un massimo di 4 settimane in contenitori o provette chiuse.²

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Wilson WJ, Blair EMMV. The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. *J Pathol Bacteriol* 1924; 119:121.
2. ISO 15213-1:2023. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique.
3. Curtis GDW, Baird RM. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology: Additional Monographs (II). Proceedings of the 6th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Heidelberg 30 March-3 April, 1992. *Int J Food Microbiol* 1993; 17:204-5.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	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	Date
Revisione 0	Prima edizione	02/2023
Revisione 1	Aggiunta dei flaconi pronti all'uso	01/2024

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

