



SULFITE POLYMYXIN SULFADIAZINE (SPS) AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento e il conteggio di *Clostridium perfringens* e altri clostridi.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA *

Idrolisato triptico di caseina	15,00 g
Estratto di lievito	10,00 g
Sodio solfito	0,50 g
Ferro citrato	0,50 g
Polimixina B solfato	0,01 g
Sulfadiazina	0,12 g
Agar	13,50 g

* 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 cibi come carne cruda, pollame, zuppe e salse disidratate, verdure crude e spezie vengono cotti e conservati senza mantenere un adeguato riscaldamento o refrigerazione prima di essere serviti.¹ Il conteggio di *C. perfringens* nei campioni alimentari gioca un ruolo chiave nelle indagini epidemiologiche sui focolai di malattie di origine alimentare. Negli anni '50 e '60 furono condotti diversi studi per sviluppare un terreno di coltura adatto che consentisse l'isolamento e il conteggio di *C. perfringens*. Mossel *et al.*² e Mossel,³ hanno riferito di un terreno agar solfito di ferro contenente 0,05% di solfito di sodio e 10 ppm di polimixina B solfato, che ha prodotto un recupero quantitativo di colture pure di diverse specie di clostridi. Angelotti *et al.*⁴ hanno modificato la formulazione di Mossel aggiungendo sulfadiazina per sopprimere la crescita di *Enterobacteriaceae* e hanno proposto l'agar solfito polimixina sulfadiazina (SPS). Il basso contenuto di solfiti nel terreno consente un adeguato annerimento delle colonie e allo stesso tempo la crescita di clostridi sensibili ai solfiti.⁵ Secondo MacFaddin⁵ il terreno può essere utilizzato per l'isolamento e il conteggio di *C. perfringens* e *Clostridium botulinum* dagli alimenti. Il terreno è moderatamente selettivo: la polimixina B e la sulfadiazina sono inibitori della maggior parte dei microrganismi diversi da *Clostridium* spp. La selettività può essere aumentata con l'aggiunta di neomicina 20 mg/L per l'inibizione del *Clostridium bifermentans*.⁴ I fattori di crescita essenziali sono forniti dal peptone di caseina mentre l'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il citrato ferrico e il solfito di sodio sono indicatori della riduzione del solfito da parte di *C. perfringens* e altri clostridi che producono colonie nere.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 39,6 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente il terreno e sterilizzare in autoclave a 118°C per 15 minuti. Raffreddare a 47°C-50°C mescolare bene e versare in piastre Petri sterili. Eventualmente dispensare prima della sterilizzazione 20 mL in provette 20x200 mm ed autoclavare a 118°C per 15 minuti.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

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

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) Agar	Terreno di coltura in polvere	4020942	500 g (12,6 L)
Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) Agar	Piastre pronte all'uso	492094	3 x 10 piastre ø 55 mm
Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5120942	6 x 100 mL
Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5120943	6 x 200 mL

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette microbiologiche, piastre Petri sterili, apparecchiatura appropriata per la coltura anaerobica, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

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, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Preparare il campione di prova, la sospensione iniziale e le diluizioni, in accordo con la norma internazionale specifica.

1. Pipettare 1 mL di diluizioni decimali dell'alimento omogeneizzato in piastre sterili e aggiungere 15-20 mL di SPS Agar.
2. Inclinare la piastra per miscelare l'inoculo con l'agar e lasciare solidificare.
3. In alternativa, inoculare per infissione in provette profonde con la sospensione iniziale del campione e le sue diluizioni.
4. Incubare le piastre o le provette a 35-37°C per 24 ore in atmosfera anaerobica.

10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie. La maggior parte dei clostridi, inclusi *C. perfringens* e *C. botulinum*, riduce il solfito a solfuro e fa diventare nere le colonie.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può 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>C. perfringens</i> ATCC 13124	37°C / 48 H / AN	crescita con colonie nere
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C / 48 H / AN	inibito

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





12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di SPS Agar disidratato (Test Batch:TB) viene valutata per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività è testata con una tecnica quantitativa per inclusione con i ceppi target *C. perfringens* ATCC 13124, *C. sporogenes* ATCC 19404 e *C. bifementans* NCTC 506: le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 35- 37°C per 48 ore in atmosfera anaerobica. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr:UFC_{TB}/UFC_{RB}). Se Pr è $\geq 0,7$ e se la morfologia ed il colore delle colonie sono tipiche (colonie nere) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. La selettività è valutata con metodo in superficie Miles-Misra modificato inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 19433. La crescita di *E. coli* è marcatamente inibita mentre la crescita di *S. aureus* ed *E. faecalis* è da discreta a buona con colonie bianche.

13 – LIMITI DEL METODO

- SPS Agar non è sufficiente per l'identificazione. Possono crescere organismi diversi dai clostridi e tutte le colonie nere devono essere controllate per la presenza di spore.⁵
- Le colonie nere devono essere confermate come *C. perfringens* mediante test appropriati: motilità (-), riduzione dei nitrati (+), acido e gas del lattosio (+), liquefazione della gelatina (+).⁶

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per 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.
- 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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- 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. 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.
- I flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni piastra e flacone di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi 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 qui descritto 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.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +2°C / +8°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'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo MacFaddin, il terreno in provetta preparato dall'utente può essere conservato a +2°C /+8°C per 6 mesi.⁵

Piastre pronte all'uso

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. 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).

Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i prodotti 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).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 16: Clostridium perfringens.



2. Mossel DAA, Debruin S, Van Diepen HMJ, Vending CMA, Zoutewelle G. The enumeration of anaerobic bacteria, and of Clostridium species in particular, in foods. J Appl Bacteriol 1956; 19:142-154.
3. Mossel DAA. Enumeration of sulphite reducing clostridia occurring in foods. J Sci Food Agr 1959; 10:662-669
4. Angelotti R, Hall HE, Foster MJ, Lewis KH. Quantitation of Clostridium perfringens in foods. Appl Microbiol 1962 May;10(3):193-9.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
6. ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens - Colony-count technique

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	 Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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