

CLOSTRIDIUM BROTH

**Reinforced Clostridium Broth per il conteggio e la coltura dei clostridi solfito riduttori.
Terreno indicato per la ricerca dei clostridi nei prodotti non sterili
con metodo armonizzato EP, USP, JP.**

FORMULA TIPICA (g/L)

Estratto di lievito	3.0
Estratto di carne	10.0
Peptone	10.0
Glucosio	5.0
Sodio cloruro	5.0
Sodio acetato	3.0
Cisteina HCl	0.5
Amido solubile	1.0
Agar	0.5

PREPARAZIONE

Sospendere 38 g di brodo in 1000 mL di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, ed autoclavare a 115°C per 20 minuti.

Al terreno può essere aggiunto sodio solfito e ferro citrato. Preparare una soluzione al 4% di sodio solfito e una soluzione al 7% di ferro citrato; riscaldare se necessario per 5 minuti la soluzione di ferro citrato per ottenere uno scioglimento completo. Sterilizzare per filtrazione le due soluzioni e conservarle a 3-5°C in bottiglie chiuse; le due soluzioni sono stabili per due settimane. Al momento dell'uso mescolare eguali volumi delle due soluzioni ed aggiungere sterilmente 0,5 mL di reattivo per ogni 25 mL di terreno.

pH finale 6.8 ± 0.2

DESCRIZIONE

Clostridium Broth corrisponde al terreno Reinforced medium for clostridia indicato dal metodo armonizzato EP, USP, JP per la ricerca dei clostridi ed è conforme alle specifiche qualitative ivi riportate.

Clostridium Broth è un terreno non selettivo indicato per l'isolamento ed il conteggio con il metodo MPN delle spore clostridi solfito riduttori nelle acque e negli alimenti. Il terreno è molto ricco e permette la crescita della maggior parte dei clostridi ma anche di molti altri anaerobi e anaerobi facoltativi.

Per evidenziare la crescita dei clostridi si può aggiungere al terreno sodio solfito e ferro citrato; comunque l'annerimento del terreno, dovuto alla riduzione del solfito a solfuro e alla sua precipitazione sotto forma di sale di ferro, non è specifico per il genere *Clostridium* poiché altri batteri come *Salmonella*, *Proteus* o alcuni ceppi di *Escherichia coli* danno la medesima reazione. Tuttavia poiché questi ultimi microrganismi sono asporigeni, la pastorizzazione e il trattamento con alcool etilico del campione li elimina completamente.

IMPIEGO

Per la determinazione dei Clostridi nei prodotti farmaceutici non sterili operare come segue.

- Preparare una diluizione 1:10 del campione (con un volume minimo di 20 mL) usando non meno di 2 g o 2 mL di prodotto da esaminare. Suddividere questa diluizione in 2 aliquote di almeno 10 mL ciascuna. Scaldare un'aliquota a 80°C per 10 minuti e raffreddare rapidamente. Non riscaldare la seconda aliquota.
- Inoculare 10 mL o la quantità corrispondente a 1 g o 1 mL di prodotto da esaminare da ciascuna delle due aliquote in Clostridium Broth. Incubare in condizioni anaerobiche a 30°C – 35°C per 48 ore. Dopo l'incubazione eseguire delle subculture da ciascuna provetta/flacone su Columbia Agar ed incubare in condizioni anaerobiche a 30°C – 35°C per 48-72 ore.
- La presenza di bastoncini con o senza endospore negativi al test della catalasi è indice della presenza di clostridi. Il risultato colturale deve essere confermato con l'identificazione biochimica.
- Il test è da considerare negativo se nel campione non vi è presenza di colonie con le caratteristiche sopra descritte o se i test di identificazione biochimica risultassero negativi.

Per l'enumerazione presunta dei clostridi nelle acque operare con il seguente metodo:

- Scaldare il campione a bagnomaria termoregolato a 75 +/- 5°C per 15 minuti.
- Aggiungere 50 mL di campione in bottiglie con tappo a vite contenente 50 mL di Clostridium Broth preparato a doppia concentrazione.
- Aggiungere 10 mL di campione ad una serie di 5 in bottiglie con tappo a vite contenente 10 mL di Clostridium Broth preparato a doppia concentrazione.
- Aggiungere 1 mL di campione ad una serie di 5 in bottiglie con tappo a vite contenenti 25 mL di Clostridium Broth preparato a concentrazione normale.
- Se necessario aggiungere 1 mL della diluizione 10^{-1} ad una serie di 5 in bottiglie con tappo a vite contenenti 25 mL di Clostridium Broth preparato a concentrazione normale.

Per una valutazione qualitativa della presenza dei clostridi solfito-riduttori inoculare 100 mL di campione in 100 mL di Clostridium Broth a doppia concentrazione.

Incubare in anaerobiosi a 37°C per 44 ore. Fare riferimento alla norma ISO 6461/1 o a test specifici per le precauzioni da adottare durante l'incubazione dei campioni poiché i clostridi producono grandi quantità di gas che possono indurre l'esplosione delle bottiglie.

Le bottiglie che mostrano annerimento del terreno quale risultato della riduzione del solfito devono essere considerate come positive. Esprimere i risultati in accordo alle regole riportate da ISO 8199.

Clostridium Broth è utilizzato anche per il conteggio delle spore di clostridi nel campione alimentare.

Per tale scopo 10 mL di una sospensione allo 0.1-0.2% dell'alimento macerato in acqua peptonata, è pastorizzata per trattamento a 75°C per 30 minuti in bagnomaria, o una porzione di alimento macerata con una eguale quantità di alcool etilico. Su tali campioni, in cui sono state distrutte le forme vegetative, si esegue un conteggio delle spore con il metodo MPN.

CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Controllo Produttività

C.perfringens ATCC 13124: crescita

C.sporogenes ATCC 19404: crescita

Incubazione a 37°C per 48 h, in condizioni anaerobiche

Per il controllo di qualità nel settore farmaceutico fare riferimento alla Farmacopea Europea edizione corrente.

CONSERVAZIONE

Conservare a 10-30°C al riparo della luce, in luogo asciutto. In queste condizioni Clostridium Broth è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento della polvere ecc.)

Conservare i flaconi o le provette preparate in laboratorio per un massimo di 1 mese a 2-8°C

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

il preparato qui descritto non è classificabile come pericoloso ai sensi della legislazione vigente ma contiene L-cisteina HCl ad una concentrazione >1% e come tale richiede la scheda di sicurezza, che deve essere consultata prima dell'uso. Come per tutti i terreni in polvere anche la sua manipolazione deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie. Non ingerire.

il preparato qui descritto deve essere usato in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare i materiali dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto. Fare riferimento alla norma ISO 6461/1 o a test specifici per le precauzioni da adottare durante l'incubazione dei campioni poiché i clostridi producono grandi quantità di gas che possono indurre l'esplosione delle bottiglie.

BIBLIOGRAFIA

- Freame, B. & Fitzpatrick, B.W.F. (1967) - The use of Differential Reinforced Clostridial Medium for the isolation and enumeration of Clostridia from foods. In «The Society for Applied Microbiology Technical series» n° 5: Isolation of Anaerobes, ed. Shapton, D.A. & Board, R. G. Vol. 5, London: Academic Press., pag. 49-55.
- Gibbs, M.B. & Freame B. (1965) - J. Appl. Bact., **28**, 95-111.
- ISO 6461/1 (1986) Water quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite reducing anaerobes (clostridia) – Part 1: Method by enrichment in a liquid medium
- Smith, L.D.S. & Holdeman, L.V. (1968) - The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Springfield: Charles C. Thomas
- Willis A.T. Hobbs, G. (1959) J. Path. Bact. **77**, 511

CONFEZIONI

4013042 Clostridium Broth, 500 g (13.1 L)