

CLOSTRIDIUM BROTH

Reinforced Clostridium Broth per il conteggio e la coltura dei clostridi solfito riduttori

FORMULA TIPICA (g/l)

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

CLOSTRIDIUM AGAR

Reinforced Clostridium Agar per la coltura ed il mantenimento dei clostridi e di altri anaerobi

FORMULA TIPICA (g/l)

Estratto di lievito	3.0
Estratto di carne	10.0
Tryptone	10.0
Glucosio	5.0
Amido solubile	1.0
Sodio cloruro	5.0
Sodio acetato	3.0
Cisteina HCl	0.5
Agar	15.0

PREPARAZIONE

Sospendere 52.5 g di agar o 38 g di brodo in 1000 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, ed autoclavare a 115°C per 20 minuti. Ai due terreni possono essere aggiunti 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 alla formulazione del Reinforced Clostridium Broth riportata da ISO 6461/1 ed al terreno Reinforced medium for clostridia indicato da European Pharmacopoeia 3rd Ed. 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* poichè altri batteri come *Salmonella*, *Proteus* o alcuni ceppi di *Escherichia coli* danno la medesima reazione. Tuttavia poichè questi ultimi microrganismi sono asporigeni, la pastorizzazione e il trattamento con alcool etilico del campione li elimina completamente.

IMPIEGO

Per l'enumerazione presunta dei clostridi nelle acque ISO 6461/1 raccomanda il seguente metodo:

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

Per una valutazione qualitative 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.

Clostridium Agar ha le stesse caratteristiche di Clostridium Broth ed è consigliabile per l'isolamento dei clostridi in coltura pura dopo conteggio su Clostridium Broth.

CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Controllo Produttività

C.perfringens ATCC 13124: crescita nera

C.sporogenes ATCC 19404: crescita nera

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

CONSERVAZIONE

Conservare a 10-30°C al riparo della luce, in luogo asciutto. In queste condizioni Clostridium Broth e Clostridium Agar sono validi 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

Clostridium Broth: 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.

Clostridium Agar: Il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni ≥1%. Come per tutti i terreni in polvere anche la sua manipolazione deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie.

I preparati qui descritti sono solo per uso diagnostico *in vitro* e devono essere usati in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le piastre 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 Clostridial 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.
- European Pharmacopoeia, 3rd ed. 2001 Supplement
- 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

4013031	Clostridium Agar,	100 g (1.9 l)
4013032	Clostridium Agar,	500 g (9.5 l)
4013041	Clostridium Broth,	100 g (2.6 l)
4013042	Clostridium Broth,	500 g (13.1 l)