

# TETRATHIONATE BROTH BASE

Terreno di coltura in polvere

## 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido selettivo per l'arricchimento di *Salmonella* da alimenti per animali e altri campioni di importanza sanitaria.

## 2 – COMPOSIZIONE

### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA \*

Peptocomplex	5 g
Sali biliari	1 g
Calcio carbonato	10 g
Sodio tiosolfato	30 g

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

## 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Mueller<sup>1</sup> descrisse per primo l'uso del brodo tetrathionato per l'isolamento delle salmonelle. La modifica della formula originale, sviluppata da Kauffmann<sup>2</sup>, con l'aggiunta di sali biliari e verde brillante per sopprimere batteri come *Proteus* spp., ha notevolmente aumentato la percentuale di risultati positivi nell'isolamento di *Salmonella* spp.

La rilevazione di *Salmonella* negli alimenti e in altri campioni di interesse sanitario, richiede quattro fasi successive: pre-arricchimento in mezzo liquido non selettivo, arricchimento in uno o due mezzi liquidi selettivi, placcatura e riconoscimento, conferma.

Tetrathionate Broth Base con l'aggiunta di soluzioni di iodio-ioduro e verde brillante è utilizzato per l'arricchimento selettivo di *Salmonella* da alimenti per animali e altri campioni di importanza sanitaria ed è conforme alla formulazione FDA-BAM.<sup>3</sup>

Peptocomplex fornisce carbonio, azoto, vitamine e minerali per la crescita microbica; gli agenti selettivi del terreno sono i sali biliari, il verde brillante e il tetrathionato di sodio che si forma dal tiosolfato di sodio quando si aggiunge al terreno la soluzione di iodio-ioduro di potassio; il carbonato di calcio neutralizza l'acido solforico che viene prodotto dalla riduzione del tetrathionato durante la crescita delle salmonelle, mantenendo il pH a valori neutri. Il terreno completo permette lo sviluppo delle salmonelle ed è inibitore per i batteri Gram-positivi e per gran parte dei batteri Gram-negativi di origine enterica.

## 4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 46 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente. Evitare il surriscaldamento, non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a 42-45° e aggiungere asetticamente 20 mL di soluzione di iodio-ioduro e 10 mL di soluzione verde brillante allo 0,1% (REF 421505). Mescolare bene e distribuire asetticamente in provette sterili in aliquote da 10 mL. Preparazione della soluzione di iodio-ioduro secondo FDA BAM<sup>4</sup>: sciogliere 5 g di ioduro di potassio in 5 mL di acqua purificata sterile; aggiungere 6 g di iodio e mescolare per sciogliere; portare a 20 mL con acqua purificata sterile.

## 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	surmatante da incolore a giallo chiaro su un precipitato bianco
pH finale (20-25 °C)	8,4 ± 0,2

## 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tetrathionate Broth Base	Terreno di coltura in polvere	4021252	500 g (10,9 L)

## 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette sterili, soluzione di iodio-ioduro, soluzione verde brillante allo 0,1% (REF 421505), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

## 8 – CAMPIONI

Alimenti, mangimi, campioni della filiera alimentare e altri campioni sanitari. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.<sup>3</sup>

## 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il seguente metodo è un riassunto tratto dalla FDA-BAM.<sup>3</sup> Nell'esame microbiologico degli alimenti, la FDA-BAM raccomanda l'uso di Tetrathionate (TT Broth) insieme a Rappaport Vassiliadis (RV) Broth o Selenite Cystine Broth (SCB) (per gomma di Guar).

TT Broth viene utilizzato come secondo brodo di arricchimento selettivo, incubato a 43°C per l'analisi di alimenti ad alta carica microbica e a 35°C per l'analisi di alimenti a bassa carica microbica.

1. Trasferire 0,1 mL di coltura di pre-arricchimento non selettiva in 10 mL di RV Broth o in 10 mL di SCB e un'altra aliquota di 1 mL in 10 mL di TT Broth.
2. Miscelare bene e incubare i terreni di arricchimento selettivo come segue:
  - Alimenti con un'elevata carica microbica: incubare RV Broth 24 ± 2 h a 42 ± 0,2°C. Incubare il TT broth per 24 ± 2 h a 43 ± 0,2°C
  - Alimenti a bassa carica microbica (eccetto gomma di guar e alimenti sospettati di essere contaminati da *S. Typhi*): incubare RV Broth 24 ± 2 h a 42 ± 0,2°C. Incubare il TT broth per 24 ± 2 h a 35 ± 2,0°C.
  - Gomma di guar e alimenti sospettati di essere contaminati da *S.Typhi*: incubare SCB e TT broth per 24 ± 2 ore a 35°C.
3. Miscelare i brodi di arricchimento selettivo e seminare 10 µl di TT broth incubato su Bismuth Sulfite Agar, XLD Agar e Hektoen Enteric Agar.
4. Trapiantare con un'ansa da 3 mm (10 µl) di RV Broth (per campioni di alimenti ad alto e basso carico microbico) e di SCB (per gomma di guar) negli stessi terreni indicati nel punto precedente.
5. Incubare le piastre per 24 ± 2 h a 35°C. Esaminare le piastre per la presenza di colonie che potrebbero essere di *Salmonella*.

## 10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso dei terreni su piastra per la descrizione delle caratteristiche delle colonie di *Salmonella*.



Contrassegnare le colonie sospette su ciascuna piastra. Selezionare le colonie sospette per la subcoltura e la conferma. Per la scelta dei test biochimici per l'identificazione di *Salmonella* e i criteri per la valutazione delle reazioni positive e negative si rimanda al Capitolo 5 della FDA-BAM.<sup>3</sup>

La conferma biochimica può essere sostituita dal test rapido MUCAP (REF 191500). Tutte le colonie positive al MUCAP Test devono essere confermate sierologicamente.

### 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
S. Typhimurium ATCC 14028	35-37°C / 21-24h A	buona crescita dopo subcoltura su TSA
E. coli ATCC 25922	35-37°C / 21-24h A	parzialmente inibito dopo subcoltura su TSA

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

### 12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima dell'immissione in vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Tetrathionate Broth Base, integrato con iodio e verde brillante, viene testato per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione ad estinzione, inoculando le provette con 1 mL di appropriate diluizioni decimali degli organismi target, incubando a 37°C per 24 ore, subcoltivando su piastre di Tryptic Soy Agar e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento (GrRB) e nel lotto del Test (GrTB). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: S. Typhimurium ATCC 14208, S. Enteritidis ATCC 13076, S. *diarizonae* ATCC 12325. L'indice di produttività Gr<sub>RB</sub>-Gr<sub>TB</sub> per ciascun ceppo target deve essere ≤ 1.

La produttività e la selettività sono testate insieme con miscele di circa 100 UFC di organismi target e 1000 UFC di organismi non target per provetta, incubando a 37°C per 24 ore. Miscele di ceppi target e non target: S. Typhimurium ATCC 14028 + E. coli ATCC 25922 + P. aeruginosa ATCC 27853. Dopo l'incubazione e la subcoltura su piastre XLD Agar, i ceppi target mostreranno più di 10 colonie per piastra. Inoltre, la selettività viene valutata inoculando circa 10.000 UFC/provetta di organismi non bersaglio, incubando a 37°C per 24 ore e subcoltivando su piastre di Tryptic Soy Agar. La selettività è testata con i seguenti ceppi non target: E. coli ATCC 25922, E. faecalis ATCC 29212. Le UFC di E. coli devono essere inferiori a 100 mentre le UFC di E. faecalis devono essere inferiori a 10 sulle piastre di Tryptic Soy Agar.

### 13 – LIMITI DEL METODO

Dopo l'arricchimento in Tetrathionate Broth, le colonie isolate sulle piastre devono essere identificate con test adeguati.

### 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](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.
- Trattare i campioni come potenzialmente 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](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.

### 15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

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'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 FDA-BAM, le soluzioni di iodio e verde brillante devono essere aggiunte alla base media il giorno dell'uso.<sup>4</sup> Secondo MacFaddin, Tetrathionate Broth Base senza l'aggiunta di soluzione di iodio può essere conservata a +2°C /+8°C in contenitori chiusi per un massimo di 2 settimane.<sup>5</sup>

### 16 - Bibliografia

- Muller L. A nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. C.R. Soc. Biol. (Paris) 1923; 89:434-443
- Kauffmann F. Weitere Erfahrungen mit den kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen. Z Hyg Infektionskr. 1935; 117: 26-32
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 03/2022.
- U.S. Food and Drug Administration. BAM Media M145: Tetrathionate (TT) Broth.





5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

<b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	<b>LOT</b> Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

### 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.

