

ISTRUZIONI PER L'USO

TRIPLE SUGAR IRON AGAR USP

Terreno di coltura in polvere


 Triple Sugar Iron Agar USP - da sinistra: provetta non inoculata, *S. Typhimurium*, *E. coli*.

1 - DESTINAZIONE D'USO

 Diagnostico *in vitro*. Terreno per la differenziazione dei membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, soprattutto *Salmonella* spp., per mezzo dei test della fermentazione degli zuccheri e della produzione di idrogeno solforato.

2 - COMPOSIZIONE
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Peptocomplex	20,000 g
Lattosio	10,000 g
Saccarosio	10,000 g
Glucosio	1,000 g
Ferro ammonio solfato	0,200 g
Sodio cloruro	5,000 g
Sodio tiosolfato	0,200 g
Agar	14,000 g
Rosso fenolo	0,025 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 La formulazione del Triple Sugar Iron Agar si basa sui tentativi di diversi microbiologi, agli inizi del 900, di sviluppare un terreno differenziale per l'identificazione dei bacilli enterici gram-negativi: Russel¹, Kligler² Krunweide e Kohn³. Nel 1940, Sulkin e Willet⁴ modificarono l'agar TSI di Krunweide e Kohn con l'aggiunta di indicatori per la messa in evidenza della produzione di idrogeno solforato. L'attuale formulazione è essenzialmente una modifica di Haja⁵ al terreno triple sugar sulphate agar di Sulkin e Willet.

 Triple Sugar Iron Agar è impiegato per la differenziazione delle colonie delle *Enterobacteriaceae*, in particolare *Salmonella* spp., per mezzo dei test della fermentazione del glucosio, lattosio e saccarosio e della produzione di idrogeno solforato.⁶ Il terreno è indicato da FDA-BAM⁷ nelle procedure di identificazione di *Salmonella*, congiuntamente ad altri test biochimici. Il terreno proposto dalla norma ISO 6579⁸ per *Salmonella* presenta una formulazione differente e corrisponde al terreno Biolife Triple Sugar Iron Agar ISO Formulation REF 402141S.

 La fermentazione degli zuccheri presenti nel TSI Agar può avvenire sia sulla superficie del becco di clarino sia in profondità con o senza presenza di gas (CO₂ + H₂) e si possono registrare tre modelli di reazione:

1-fermentazione del glucosio; 2-fermentazione del glucosio, del lattosio e/o del saccarosio; 3-nessuna fermentazione.

Nel primo caso dopo 18-24 ore di incubazione si osserva una reazione alcalina sullo slant e una reazione acida in profondità. L'utilizzazione completa del glucosio, presente alla concentrazione dello 0,1%, in superficie, dove esistono condizioni aerobiche, dopo 18-24 ore induce un attacco catabolico dei peptoni da parte dei microrganismi con produzione di ione ammonio, alcalinità e viraggio del rosso fenolo verso il rosso (reversione della reazione da acida ad alcalina). In profondità, invece, dove esistono condizioni anaerobiche si registra unicamente una fermentazione del glucosio a prodotti acidi stabili con conseguente viraggio dell'indicatore verso il giallo (pH acido). Nel secondo caso, quando siano presenti microrganismi che fermentano il glucosio ed uno o entrambi gli altri due zuccheri, si registra dopo 18-24 ore di incubazione una reazione acida in superficie ed in profondità. Ciò è dovuto alla elevata concentrazione del lattosio e del saccarosio: dopo 18-24 ore non è ancora terminata in superficie la loro degradazione e quindi non si ha alcun attacco dei peptoni e quindi nessuna reversione della reazione.

 Nel terzo modello sperimentale si registra una reazione alcalina sia in superficie che in profondità. Questo comportamento non è tipico delle *Enterobacteriaceae* ma di alcuni batteri Gram negativi non enterici presenti nell'intestino che non fermentano i tre zuccheri ma possono degradare i peptoni (*Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). Se la degradazione dei peptoni è anaerobica si ha un viraggio dell'indicatore verso il rosso (pH alcalino) sia in superficie che in profondità, se la degradazione è aerobica, in profondità non c'è alcun cambiamento di colore del terreno.

 Su TSI si può osservare anche la produzione di acido solfidrico a partire dal sodio tiosolfato e dal ferro ammonio solfato quando l'ambiente sia acido. Esso è evidenziato da un apposito indicatore, il ferro solfato, che in presenza di H₂S, precipita sotto forma di ferro solfuro nero.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 60,4 g di polvere in 1000 ml di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione per sciogliere completamente il terreno. Distribuire in provette ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare in posizione inclinata in modo da ottenere un fondo alto e un becco corto.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, rosata.

Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta

Rosso-arancio limpido.

pH (20-25°C)

7,3 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Triple Sugar Iron Agar	Terreno di coltura in polvere	4021412	500 g (8,2 L)



**7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI**

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette autoclavabili, anse ed aghi da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

Triple Sugar Iron Agar non deve essere usato per la semina diretta del campione clinico. Il campione è costituito da colture pure di enterobatteri isolati da campioni clinici o altri materiali.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Caricare un ago da batteriologia con la crescita di una colonia pura del microrganismo da identificare. Sottoporre ad esame numerose colonie coltivate sulla piastra d'isolamento primario. Se si ritiene che le colonie non siano pure ritrapantarle su Tryptic Soy Agar e con esse seminare le provette di TSI.

Seminare infiggendo l'ago fino sul fondo del terreno e strisciando abbondantemente sulla superficie del becco di clarino. Incubare a 35-37°C per 18-24 ore con i tappi allentati.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sul terreno si possono osservare tre tipi di reazione.⁸

Fermentazioni degli zuccheri

Fondo acido (giallo), becco alcalino (rosso): fermentazione del glucosio, nessuna fermentazione del saccarosio o del lattosio.

Fondo acido (giallo), becco acido (giallo): fermentazione del lattosio e/o del saccarosio.

Fondo alcalino (rosso), becco alcalino (rosso): nessuna fermentazione dei tre zuccheri

Produzione di gas

Presenza di bolle nel contesto del terreno. Con grandi quantità di gas, l'agar può essere incrinato e spostato verso l'alto.

Produzione di idrogeno solforato

La produzione di idrogeno solforato dal tiosolfato è indicata da un annerimento del fondo a seguito della reazione di H₂S con gli ioni ferro per formare ferro solfuro nero. La formazione di H₂S richiede un ambiente acido; a volte il fondo può risultare interamente nero tale da mascherarne il colore giallo; in tal caso, si presume che il fondo sia acido.

Su Triple Sugar Iron Agar possono essere osservate tutte le combinazioni delle reazioni sopra descritte, quindi è importante prendere nota dell'espressione delle tre reazioni (fermentazione degli zuccheri, produzione di gas, produzione di H₂S). Nella tabella che segue, tratta da Mac Faddin,⁹ sono riportati i modelli di reazione di alcune *Enterobacteriaceae*

Microorganismo	Lac	Suc	Glu	Gas	H ₂ S
<i>Edwardsiella</i>	-	-	A	+	+
<i>Escherichia coli</i>	A ¹	V	A	V ⁺	-
<i>Shigella</i>	V ⁻³	V ⁻¹	A	V ⁻²	-
<i>Klebsiella</i>	A	A	A	+	-
<i>Enterobacter</i>	V	V ⁺	A	V ⁻⁶	-
<i>Hafnia</i>	V ⁻	V ⁻	A	V ⁺	-
<i>Serratia</i>	V ⁻	A	A	V ⁻	-
<i>Morganella</i>	-	-	A	V ⁺	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	V ⁻¹	A	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	A	A	V ⁷	+
<i>Proteus rettgeri</i>	-	V ⁻¹	A	V ⁺	+ ⁵
<i>Salmonella</i>	- ⁴	-	A	V ⁺	+
<i>Salmonella arizonae</i>	V ⁺¹	V ⁻	A	+	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	V	V ⁻	A	+	-
<i>Citrobacter diversus</i>	V	V ⁻	A	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	A ¹	V ⁻	A	+	-
<i>Yersinia</i>	-	V	A	V	-

Note

Lac: fermentazione del lattosio; Suc: fermentazione del saccarosio; Glu: fermentazione del glucosio; A: reazione acida; V: variabile; V⁺: variabile, di solito positivo; V⁻: variabile, di solito negativo. 1: la reazione può essere ritardata; 2: *S.flexneri* ser.6 positiva alla produzione di gas in piccola quantità; 3: di solito negativo con l'eccezione di *S.sonnei* (la reazione acida può essere ritardata); 4: anche se rare vi sono varianti lattosio positive di *S.Typhi*; 5: *S.Typhi* può mostrare un anello di annerimento ma la sua presenza non è di valore diagnostico, per *S.Paratyphi A H₂S+*, la reazione positiva è ritardata; 6: *E.agglomerans* è variabile alla produzione di gas; 7: nel caso fosse prodotto gas, esso è in piccole quantità.

11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito

sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità:

E.coli ATCC 25922: crescita, becco giallo, fondo giallo, gas + H₂S -
S.flexneri ATCC 12022: crescita, becco rosso, fondo giallo, gas - H₂S -
S.Typhimurium ATCC 14028: crescita, becco rosso, fondo giallo, gas + H₂S +
 Incubazione con tappi allentati in aerobiosi, a 35-37°C per 18-24 h.

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Triple Sugar Iron Agar viene testato per le caratteristiche prestazionali confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. Colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 7 ceppi di *Enterobacteriaceae* sono inoculate nelle provette: *E.coli* ATCC 25922, *C.freundii* ATCC 8090, *P.rettgeri* ATCC 39944, *S.Enteritidis* ATCC 13076, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.flexneri* ATCC 12022, *S.sonnei* ATCC 9290. Dopo l'incubazione in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore, vengono registrati i cambiamenti di colore del terreno sul becco di clarino e nel fondo, la presenza di gas e di annerimento. Tutti i ceppi mostrano delle reattività in accordo alle specifiche in entrambi i lotti testati.

13 - LIMITI DEL METODO

- È necessario inoculare per infissione il terreno con un ago da microbiologia senza rompere l'agar (non usare anse).
- È essenziale eseguire la lettura tra le 18 e le 24 ore di incubazione; letture precoci possono indurre falsi risultati di acidità del tipo A/A oppure non vi è tempo sufficiente per la fermentazione degli zuccheri con conseguente viraggio dell'indicatore; letture ritardate possono dare falsi risultati K/K a causa dell'utilizzo dei peptoni e conseguente viraggio alcalino del terreno.⁹





- La produzione di H₂S può mascherare la reazione acida sul fondo, tuttavia la produzione di H₂S richiede condizioni acide quindi il fondo si deve considerare acido quando vi è annerimento.
- È stato riportato da Bulmash e Fulton¹⁰ che la fermentazione del saccarosio può sopprimere il meccanismo enzimatico responsabile della produzione di idrogeno solforato. Padron e Dockstader¹¹ riferiscono che non tutti i ceppi di *Salmonella* produttori di H₂S presentano annerimento della provetta di TSI, mentre risultano H₂S+ su Kligler Iron Agar.
- È possibile che alcuni microrganismi H₂S positivi mostrino annerimento del terreno SIM Medium ed una reazione negativa su TSI.⁹
- Il terreno non contiene inibitori quindi una grande varietà di microrganismi può coltivare su di esso; per questa ragione prima della semina assicurarsi che la colonia sia catalasi positiva e si sia in presenza di bacilli Gram negativi.
- Il saccarosio è presente nel TSI per differenziare alcuni ceppi fermentanti il saccarosio ma non il lattosio come *Proteus* e *Citrobacter* spp.⁹
- Assicurarsi che le colonie da sottoporre al test siano pure. Nel caso la coltura non fosse pura si ottengono risultati irregolari.
- Le specie del gruppo *Klebsiella-Enterobacter* producono una tale quantità di gas per cui il terreno è spinto verso il tappo della provetta; in questi casi porre molta attenzione nei successivi ri-trapianti per evitare contaminazioni.
- È essenziale che i tappi siano allentati durante l'incubazione poiché per un corretto svolgimento della reazione alcalina sul becco del clarino vi deve essere passaggio d'aria nella provetta. Nel caso i tappi siano troppo chiusi si realizza una reazione acida sul becco anche in presenza della sola fermentazione del glucosio.⁹
- L'identificazione completa dei microrganismi coltivati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato, e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, 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 in provetta o in flacone.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti 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.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo del terreno e della definizione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (provette/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Russell FF. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. *J Med Res* 1911; 25:21
2. Kligler IJ. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. *Am J Public Health* 1917; 7:1042-1044
3. Krumwiede C, Kohn L. A triple sugar modification of the Russell Double Sugar medium. *J Med Res* 1917; 37:225.
4. Sulkin SE, Willet JC. A triple sugar ferrous sulphate medium for use in identification of enteric organisms. *J Lab Clin Med* 1940; 25:649.
5. Hajna AA. Triple sugar iron agar medium for the identification of intestinal group of bacteria. *J Bacteriol* 1945; 49:516.
6. Atlas R, Parks LC. *Handbook of Microbiological Media*. 2nd edition CRC Press, 1997
7. U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella*. Rev 12/2019
8. Lehman D. Triple sugar iron agar protocols. American Society for Microbiology 2015.
9. MacFaddin JF. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
10. Bulmash JM, Fulton MD. Discrepant tests for hydrogen sulfide. *J Bacteriol* 1964; 88(2):1813
11. Padron AP, Dockstader WB. Selective medium for hydrogen sulfide production *Appl Microbiol* 1972; 23:1107



**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

 REF Numero di catalogo	o REF	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura		 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 5	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	01/2022
Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

