

**ISTRUZIONI PER L'USO****TRYPTIC SOY AGAR****Terreno di coltura in polvere***Bacillus cereus* su Tryptic Soy Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale per la coltivazione, ed il mantenimento di microrganismi esigenti e moderatamente esigenti. Per l'enumerazione microbica in prodotti farmaceutici non sterili e cosmetici. Addizionato di sangue defibrinato animale, Tryptic Soy Agar è indicato per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti da campioni clinici ed altri materiali e per la determinazione delle proprietà emolitiche dei batteri.

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

Digerito pancreatico di caseina	15 g
Peptone di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Tryptic Soy Agar (TSA) è uno dei terreni di coltura più utilizzati in microbiologia clinica ed industriale. TSA ha una moltitudine di applicazioni nei laboratori clinici e non clinici tra cui l'isolamento, la coltivazione e la purificazione di colonie di microrganismi non esigenti e moderatamente esigenti ed il mantenimento dei ceppi in coltura.¹ Poiché non contiene i fattori X e V, esso è adatto per l'identificazione di *Haemophilus* spp., aggiungendo sulla superficie dell'agar dischi o strisce impregnate di Fattore X (emina) e Fattore V (NAD).² TSA è indicato come terreno di riferimento quando si debba misurare la produttività dei terreni selettivi.³ TSA è il terreno indicato come "casein soya bean digest agar" dal metodo armonizzato EP, USP, JP⁴ per la conta microbica totale nei prodotti farmaceutici non sterili. È raccomandato dalla norma ISO 21149 per l'enumerazione ed il rilevamento dei batteri mesofili aerobi nei cosmetici.⁵

Tryptic Soy Agar può essere addizionato di sangue defibrinato animale (a concentrazioni tra il 5% e il 7%) per la preparazione di un terreno più nutriente, adatto alla crescita di organismi esigenti; l'aggiunta di sangue animale consente la determinazione delle proprietà emolitiche dei ceppi isolati come utile strumento nell'orientamento dell'identificazione batterica.

TSA può essere addizionato con 0,7 g/L di lecitina e 5 g/L di polisorbato 80 per la determinazione del contenuto microbico di prodotti, aree sanitarie e contenitori, trattati con disinfettanti.⁶

TSA con l'aggiunta di sale può essere utile per determinare il livello di alotolleranza dei microrganismi.⁶

Tryptic Soy Agar è preparato con peptoni di caseina e di soia selezionati che rendono il terreno particolarmente nutriente grazie al loro contenuto in azoto organico, sotto forma di aminoacidi e polipeptidi. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico e l'agar è l'agente solidificante del terreno.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 40 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e trasferire in piastre di Petri sterili.

Note. Il terreno può anche essere distribuito in provette prima della sterilizzazione e raffreddato in posizione inclinata.

Per la preparazione di piastre al sangue, al terreno sterilizzato in autoclave e raffreddato a 47-50°C, aggiungere il 5-7% di sangue defibrinato animale, mescolare bene e distribuire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, giallo chiaro

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

limpido di colore giallo chiaro

pH (20-25°C)

7,3 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptic Soy Agar	Terreno di coltura in polvere	4021502	500 g (12,5 L)
		4021504	5 kg (125 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, provette, flaconi o beute autoclavabili, anse, aghi, tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori. Se richiesto, sangue defibrinato animale.





8 - CAMPIONI

Il terreno senza addizione di sangue animale non è adatto alla semina diretta di campioni clinici. Generalmente il terreno qui descritto è utilizzato per la sub-coltura di microrganismi coltivati su altri terreni di coltura.

Campioni non di origine clinica analizzati con Tryptic Soy Agar possono essere prodotti farmaceutici non sterili e cosmetici. Consultare la letteratura citata per le procedure di raccolta e preparazione dei campioni.^{4,5}

Le piastre di agar sangue preparate con TSA possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici umani raccolti da siti sterili e non. Consultare la bibliografia citata per i campioni da esaminare in rapporto a specifiche infezioni.⁷⁻⁹ Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica ed applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.⁷

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. Per la sub coltura delle colonie, inoculare, con un ago o un'ansa da batteriologia il terreno in piastra con una colonia coltivata su altro terreno d'isolamento. Incubare alla temperatura e per il tempo previsto dalle proprie procedure ed in funzione del microrganismo che si desidera coltivare.

Inoculare le piastre di agar sangue preparate con TSA, con il campione clinico in esame, strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra, quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare a 35-37 °C in aerobiosi o in atmosfera al 5-10% di CO₂ ed osservare dopo 18-24, 48 e, se necessario, 72 ore.

L'utilizzatore è responsabile della scelta del tempo di incubazione, della temperatura e dell'atmosfera appropriata, a seconda del campione in esame, delle esigenze nutrizionali degli organismi da isolare e dei protocolli operativi locali applicabili.

Per l'esame di prodotti farmaceutici e cosmetici riferirsi ai metodi descritti dalla Farmacopea⁴ e dalla norma ISO applicabile⁵.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di microrganismi è indicata dalla comparsa di colonie di varia morfologia e dimensione sulla superficie del terreno. Le caratteristiche delle crescite sono in stretto rapporto al tipo o ai tipi di microrganismi coltivati.

Su piastre con sangue di montone si possono evidenziare i seguenti tipi di emolisi:

1. α-emolisi: emolisi parziale delle emazie con la formazione di alone grigio-marrone-verdastro attorno alle colonie.
2. β-emolisi: emolisi complete dei globuli rossi con la formazione di una zona trasparente attorno alle colonie.
3. γ o non-emolisi: i globuli rossi non sono emolizzati e non vi è alcuna modifica del terreno attorno alle colonie.
4. Emolisi α-prime: presenza di una piccola zona di emolisi completa del sangue attorno alla colonia, circondata da un alone di lisi parziale delle emazie di colore verdastro; questo tipo di emolisi è piuttosto rara.

11 - CONTROLLO QUALITÀ

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 facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità del terreno privo di supplementi.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	37°C / 24H / A	buona crescita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C / 24H / A	buona crescita

Per il controllo di qualità nel settore farmaceutico e cosmetico fare riferimento alla Farmacopea Europea edizione corrente ed alla norma ISO 21149.

A: incubazione in aerobiosi; 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 terreno disidratato Tryptic Soy Agar (test batch: TB), non supplementato ed addizionato con sangue di montone, viene testato per la produttività e la verifica dei modelli emolitici, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato (RB).

La produttività del TSA non supplementato è testata con un test quantitativo con i seguenti ceppi: *P.aeruginosa* ATCC 9027, *E.coli* ATCC 25922, *B.cereus* ATCC 11778, *B.subtilis* ATCC 6633, *S.aureus* ATCC 6538, *S.aureus* ATCC 25923, *L.monocytogenes* ATCC 13932, *C.albicans* ATCC 10231, *A.brasiliensis* ATCC 16404. Le piastre TSA vengono inoculate con appropriate diluizioni decimali in soluzione salina delle sospensioni delle colonie e incubate a 30-35°C per 24-72 ore. Le colonie sviluppate sulle piastre sono contate per entrambi i lotti ed è calcolato il rapporto di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Se $Pr \geq 0,7$ e se la morfologia delle colonie è tipica, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La produttività del TSA addizionato con il 5% di sangue defibrinato di montone è valutata con tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi: *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 12386, *S.aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore vengono valutati e registrati i tipi di emolisi e l'entità della crescita. Tutti i ceppi mostrano una buona crescita con modelli emolitici tipici.

13 - LIMITI DEL METODO

- La crescita ed il tipo di emolisi sulle piastre di agar sangue preparate con TSA dipendono dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo; è possibile che alcuni ceppi non siano in grado di coltivare sul terreno e/o dimostrino modelli emolitici diversi dall'atteso.
- Sulle piastre al sangue di montone preparate con TSA, non cresce *Haemophilus influenzae*, che richiede sia il fattore X che il fattore V,¹⁰ né si sviluppano adeguatamente *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Bordetella* ed altri microrganismi con particolari esigenze nutritive. Per l'isolamento di queste specie utilizzare terreni di coltura specifici.
- Quando si usano piastre al sangue preparate con TSA, per isolare e riconoscere i patogeni contenuti nel campione, seminare il materiale in esame anche su appropriati terreni selettivi e sull'agar cioccolato.
- Le colonie microbiche presenti sulle piastre, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche, morfologiche ed emolitiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura 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 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 piastra o 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 del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi), dei supplementi addizionati e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Atlas R, Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition CRC Press, 1997
- Ledeboer NA, Doern GV. Haemophilus. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.667.
- ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media
- European Pharmacopoeia, current edition
- ISO 21149:2017. Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
- Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneve: World Health Organization.
- Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
- Nye KJ, Fallon D, Gee B, Messer S, Warren RE, Andrews N. A comparison of blood Agar supplemented with NAD with plain blood agar and chocolate blood agar in the isolation of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus Influenzae from sputum. Bacterial Methods Evaluation Group J Med Microbiol 48 (12), 1111-1114 Dec 1999

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	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 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 6	Modifiche a: "destinazione d'uso", "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	11/2021
Revisione 7	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

