



TRYPTONE SULFITE NEOMYCIN (TSN) AGAR

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento e il conteggio di *Clostridium perfringens* negli alimenti e in altri materiali.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Tryptone	15,00 g
Estratto di lievito	10,00 g
Sodio solfito	1,00 g
Ferro citrato	0,50 g
Neomicina solfato	0,05 g
Polimixina B solfato	0,02 g
Agar	13,50 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'intossicazione alimentare causata da *Clostridium perfringens* può verificarsi quando alimenti come carni crude, pollame, zuppe e salse disidratate, verdure crude e spezie vengono cotti e conservati senza mantenere un adeguato riscaldamento o refrigerazione prima di essere serviti¹.

Negli anni '50 e '60 sono stati condotti diversi studi per sviluppare un terreno di coltura adatto che consentisse l'isolamento e il conteggio di *C. perfringens*.

Il Tryptone Sulfite Neomycin (TSN) Agar è preparato secondo la formulazione proposta da Marshall *et al.*² che hanno modificato il terreno di Mosse³ per il conteggio dei clostridi solfito-riduttori negli alimenti. Il TSN Agar viene utilizzato per l'isolamento e il conteggio di *C. perfringens* negli alimenti e in altri materiali, con incubazione a 46°C. Il terreno di coltura può essere utilizzato sia per infissione nelle provette sia per semina diretta su piastra.

La neomicina e la polimixina B inibiscono i batteri Gram-negativi che li accompagnano e sono parzialmente inibitori per il *Clostridium bifermens*. La temperatura di incubazione relativamente alta aiuta a rilevare in modo più specifico il *C. perfringens*. I fattori di crescita essenziali sono forniti dal triptone mentre l'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il citrato ferrico e il solfito di sodio sono indicatori della riduzione del solfito da parte di *C. perfringens*, che cresce con colonie nere.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 40 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente il terreno di coltura e sterilizzare in autoclave a 115°C per 20 minuti. Raffreddare a 47°C-50°C, mescolare bene e versare in piastre Petri sterili. Se necessario, prima della sterilizzazione, dispensare 20 mL in provette 20x200 mm e autoclavare a 115°C per 20 minuti.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallastra
Aspetto della soluzione	gialla, limpida
pH finale (20-25 °C)	7,2 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptone Sulfite Neomycin (TSN) Agar	Terreno di coltura in polvere	4021592	500 g (12,5 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette microbiologiche, piastre di Petri sterili, apparecchiatura adeguata per la coltura anaerobica, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Alimenti e mangimi per animali. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare il campione da analizzare, la sospensione iniziale e le diluizioni, in conformità con la specifica norma internazionale relativa al prodotto in questione.

Inoculare le provette o le piastre del terreno di coltura con la sospensione iniziale del campione e le sue diluizioni. Incubare per 18-24 ore a 46 ± 0,1°C in atmosfera anaerobica.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie. Su TSN Agar, *C. perfringens* produce solitamente colonie nere o grigie come risultato della riduzione del solfito a solfuro.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente 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.²



CEPPI DI CONTROLLO
C. perfringens ATCC 13124
E. coli ATCC 25922

INCUBAZIONE T° / T - ATM
 46°C / 18-24 H / AN
 46°C / 18-24 H / AN

RISULTATI ATTESI
 crescita con colonie nere
 inibito

AN: incubazione anaerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di TSN Agar disidratato viene sottoposto a test di produttività e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, seminando il terreno di coltura con opportune diluizioni decimali di organismi target, incubando a 46°C per 18-24 ore in atmosfera anaerobica e registrando la diluizione più alta che mostra crescita e annerimento nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto di prova (G_{TB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *C. perfringens* ATCC 13124, *C. perfringens* ATCC 12916. L'indice di produttività $G_{RB}-G_{TB}$ per ciascun ceppo in esame deve essere ≤ 1 . Le crescite presentano il tipico annerimento del terreno.

La selettività viene testata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, seminando il terreno di coltura con diluizioni decimali appropriate di organismi non target, incubando a 46°C per 18-24 ore in atmosfera anaerobica e registrando la diluizione più alta che si manifesta nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto di prova (G_{TB}). La selettività è testata con i seguenti ceppi non target: *C. bifermentans* NCTC 506, *E. coli* ATCC 25922, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. I ceppi non target sono parzialmente o totalmente inibiti e l'indice di selettività $G_{RB}-G_{TB}$ per ciascun ceppo in esame è ≥ 1 .

13 – LIMITE DEL METODO

Le colonie nere devono essere confermate come *C. perfringens* mediante test appropriati: motilità (-), riduzione dei nitrati (+), acido e gas del lattosio (+), liquefazione della gelatina (+).

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno disidratato deve essere maneggiato con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede 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 Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito 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 dei prodotti, 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'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo Marshall *et al.* il TSN Agar deve essere utilizzato il giorno stesso della preparazione.¹

16 - REFERENCES

- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 16: Clostridium perfringens.
- Marshall RS, Steenbergen JF, McClung LS, Mossel DAA. Rapid technique for the enumeration of Clostridium perfringens. Appl Microbiol 1965 Jul;13(4):559-63.
- Mossel DAA. Enumeration of sulphite reducing clostridia occurring in foods. J Sci Food Agr 1959; 10:662-669.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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