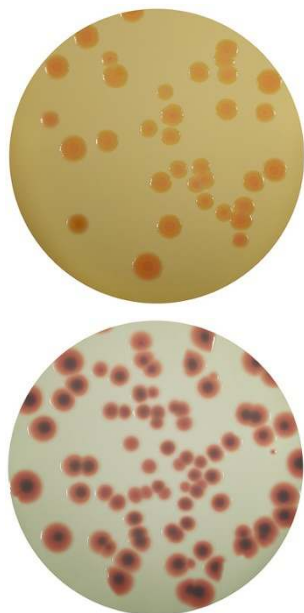


TTC TERGITOL 7 AGAR BASE

TTC TERGITOL 7 AGAR

TTC SOLUTIONS

Terreno in polvere, supplementi e piastre pronte all'uso.



TTC Tergitol 7 Agar- dall'alto al basso: colonie di *E. coli* e *Salmonella* sp. Su filtri a membrana

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio di coliformi ed *Escherichia coli* in campioni di acqua mediante la tecnica di filtrazione su membrana.

2- COMPOSIZIONI -FORMULA TIPICA *

TTC TERGITOL 7 AGAR BASE – TERRENO IN POLVERE (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)

Estratto di lievito	6,00 g
Peptone	10,00 g
Estratto di carne	5,00 g
Lattosio	20,00 g
Blu di bromotimolo	0,05 g
Tergitol 7	0,10 g
Agar	13,00 g

TTC 0.05% SOLUTION REF 421510 (CONTENUTO DEL FLACONE)

trifeniltetrazolio cloruro (TTC)	0,0125 g
Acqua purificata	25 mL

TTC 1% SOLUTION REF 42111801 (CONTENUTO DEL FLACONE)

trifeniltetrazolio cloruro (TTC)	0,3 g
Acqua purificata	30 mL

TTC TERGITOL 7 AGAR (PIASTRE PRONTE)

TTC Tergitol 7 Agar Base	54 g
TTC 1% Solution	2.5 mL
Acqua purificata	1000 mL

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Tergitol 7 agar è stato introdotto per la prima volta da Chapman¹ nel 1947. Il terreno produceva una morfologia coloniale coerente e caratteristica con *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* e altri batteri Gram-negativi. Questo terreno è stato successivamente modificato da Chapman² per includere 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro ed è stato raccomandato come terreno di elezione per la rilevazione quantitativa di *E. coli* nell'acqua potabile.³

TTC Tergitol Agar è raccomandato dallo standard ISO 9308-1:2000⁴, in seguito sostituito dalla versione 2014, per la rilevazione e la conta di *E. coli* e coliformi nell'acqua potabile utilizzando il metodo di filtrazione su membrana.

Il peptone e l'estratto di manzo forniscono azoto e minerali per la crescita microbica, l'estratto di lievito è una fonte di complesso di vitamine del gruppo B per la stimolazione della crescita, il lattosio è un carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia. Tergitol-7 agisce come agente tensioattivo che inibisce la crescita della maggior parte dei batteri Gram-positivi e la sciamatura di *Proteus*. Il blu di bromotimolo è un indicatore di pH: l'elevata concentrazione di acidi prodotti durante la fermentazione del lattosio vira l'indicatore del blu di bromotimolo dal verde al giallo. Il TTC è un indicatore sensibile della deidrogenasi⁵ e la sua riduzione a formazano insolubile da parte di batteri lattosio-negativi produce colonie rosso scuro. Per il tipico *E. coli*, nelle normali condizioni d'uso, il TTC non è un soddisfacente accettore di idrogeno e viene ridotto debolmente, per cui le colonie sono di colore giallo-arancio.⁵

4- PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 27 g in 500 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C ed aggiungere in condizioni asettiche, 1,25 mL di TTC Solution 1% (REF 42111801) o il contenuto di un flacone (25 mL) di TTC Solution 0,05% (REF 421510). Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto del terreno disidratato	polvere fine, omogenea, di colore blu pallido
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	grigio, limpido.
Aspetto del supplemento TTC	liquido limpido incolore
pH finale del terreno completo (20-25°C)	7,2 ± 0,1

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
TTC Tergitol Agar Base	Terreno in polvere	402160T2	500 g (9.3 L)
TTC 0.05% Solution	Supplemento liquido	421510	10 x 25 mL
TTC 1% Solution	Supplemento liquido	42111801	30 mL
TTC Tergitol Agar	Piastre pronte all'uso	492160T	3 x 10 piastre ø 55 mm



7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia e pipette, filtri a membrana, terreni di coltura e reagenti accessori.

8 - CAMPIONI

Campioni d'acqua. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire la buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

1. Filtrare un volume appropriato di acqua a seconda della carica microbica prevista su due filtri a membrana.
2. Adagiare i filtri a membrana sulla superficie di due piastre di TTC Tergitol 7 Agar, evitando la formazione di bolle d'aria tra il filtro e la superficie dell'agar.
3. Incubare una piastra a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-24 ore (coliformi totali) e l'altra a $44,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 18-24 ore (*E. coli*).
4. Subcoltivare le colonie caratteristiche in un agar non selettivo come Tryptic Soy Agar (REF 402150) e in Tryptone Tryptophan Medium (REF 402165).
5. Incubare l'agar non selettivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-24 ore ed eseguire il test dell'ossidasi.
6. Incubare la provetta Tryptone Tryptophan Medium a $44,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ per 18-24 ore ed esaminare la produzione di indolo aggiungendo poche gocce del reagente di Kovacs (REF 19171000).

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, esaminare le membrane e contarle come batteri lattosio-positivi, le colonie sviluppano una colorazione gialla nel terreno sotto la membrana.

Contare tutte le colonie che producono una reazione ossidasi negativa come coliformi.

Contare tutte le colonie che producono una reazione ossidasi negativa e una reazione indolo positiva come *E. coli*.

Colonie tipiche su TTC Tergitol 7 Agar:

E. coli cresce con colonie gialle con zone gialle talvolta con centro color ruggine.

Enterobacter/Klebsiella spp. presentano colonie verdastre/gialle.

Microrganismi lattosio negativi come *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas* crescono con colonie rosse con zone bluastre.

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 facoltà 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / t / ATM	SPECIFICHE
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°/ 18-24 H-A	growth with yellow colonies and yellow zones
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°/ 18-24 H-A	partially inhibited

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

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, i campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno disidratato e di piastre pronte all'uso di TTC Tergitol 7 Agar (lotto di test:TB) vengono testati per produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con Tryptic Soy Agar.

La produttività è testata con metodo quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* CIP 106878, *C. freundii* ATCC 43864, *E. aerogenes* ATCC 13048: le membrane filtranti adagate sulle piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 37°C per 18-24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività ($Pr:CFU_{TB}/CFU_{TSA}$). Se $Pr \geq 0,5$ e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie dal giallo all'arancione con zone gialle) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La specificità viene valutata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con il ceppo non target *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore il ceppo non target presenta colonie rosso-viola con zone bluastre.

La selettività viene valutata con il metodo della goccia in superficie Miles-Misra modificato, inoculando le membrane con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923 ed *E. faecalis* ATCC 19433. La crescita di *S. aureus* è totalmente inibita mentre la crescita di *E. faecalis* è parzialmente inibita.

13- LIMITI DEL METODO

- In casi particolari, può essere necessaria l'identificazione dei batteri coliformi, ad esempio per distinguere tra ceppi fecali e acquatici/tellurici.⁵

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I prodotti qui descritti sono da impiegare per controlli microbiologici, sono per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti devono essere usati congiuntamente in accordo al metodo di preparazione indicato.
- I terreni in polvere ed i supplementi devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.
- Questo terreno di coltura 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 questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare i prodotti 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.
- Fare attenzione quando si apre l'anello metallico per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.





- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura, supplemento o agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno di base ed il supplemento non utilizzati ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti qui descritti 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 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

Terreno in polvere - 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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento liquido - Dopo il ricevimento, conservare il prodotto nella confezione originale a +2°C /+8°C al riparo dalla luce diretta. Se correttamente conservato, il prodotto è utilizzabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta; non utilizzare oltre tale data. Prima dell'uso, esaminare la soluzione e scartarla se sono presenti evidenti segni di deterioramento (ad esempio contaminazione, colore atipico o altre caratteristiche anomale).

Piastre pronte all'uso - Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C /+8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a +2°C /+8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e controllo qualità dei terreni preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre/flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio). Secondo la norma ISO 9308-1:2000 le piastre preparate autonomamente possono essere conservate a +2°C /+8°C al buio e protette dall'evaporazione fino a 10 giorni.⁴

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Chapman GH. A superior culture medium for the enumeration and differentiation of coliforms. J Bacteriol. 1947;53(4):504.
2. Chapman GH. A culture Mmedium for detecting and confirming Escherichia coli in ten hours. Am J Public Health Nations Health. 1951; 41(11 Pt 1): 1381.
3. Kulp W L, Mascoli C, Taushanjian O. Use of Tergitol-7 Triphenyl Tetrazolium chloride agar as the coliform confirmatory medium in routine sanitary water analysis. Am J Public Health. 1953; 43:1111-1113.
4. ISO 9308-1 (2000) Withdraw. Water Quality: Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method.
5. Kulp WL, Mascoli C, Tavshanjian O. Use of Tergitol-7 Triphenyl Tetrazolium Chloride Agar as the Coliform Confirmatory Medium in Routine Sanitary Water Analysis. Am J Public Health Nations Health. 1953 Sep; 43(9): 1111–1113.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF or REF Catalogue number	LOT Batch code	Manufacturer	For single use only	This side up	Store in a dry place
Temperature limitation	Content sufficient for <n> tests	Consult Instruction s for Use	Use by	Fragile	Keep away from direct light

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 2	Modifiche del contenuto e del layout	03/2023

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

